

<p>2004-215841/21 C06 D16 E15 (D13) <b>SUNG- 2002.08.20</b>  SUNGENE GMBH &amp; CO KGAA *DE 10238979-A1  2002.08.20 2002-1038979(+2002DE-1038979) (2004.02.26) A01H  5/00, C12N 15/52  <b>Preparing zeaxanthin and its precursors or products, useful as food and feed supplements, comprises growing transgenic plants that have reduced epsilon-cyclase activity</b>  <b>C2004-085424</b></p>	<p><b>NOVELTY</b>  Preparing zeaxanthin (I), and/or its biosynthetic intermediates and/or downstream products, comprising culturing genetically modified plants (A) that, compared with the wild type, have reduced epsilon-cyclase (eC) activity, where this reduction is caused by a double-stranded eC RNA sequence (II), is new.</p> <p><b>DETAILED DESCRIPTION</b>  <b>INDEPENDENT CLAIMS</b> are also included for:  (1) RNA construct (B) containing RNA that has a double-stranded (ds) region that comprises a sequence identical with at least part of a plant's own eC transcript and/or a plant's own eC promoter sequence;  (2) nucleic acid construct (C) that can be transcribed to:</p>
<p>C(3-A, 4-A8E, 4-E2, 4-E4, 4-E6, 4-E7, 6-A2, 10-E4A, 10-F2, 10-J2) D(3-H1E, 3-H1P, 5-H12D2, 5-H12D6, 5-H16B) E(6-A2D, 10-E4C2, 10-E4F, 10-F2A1, 10-J2A1, 10-J2C3, 11-M) .10</p> <p>(a) a sense RNA strand containing a sequence essentially identical with at least part of the eC sense RNA transcript; and  (b) an antisense RNA essentially, especially completely, complementary to (a);  (3) nucleic acid construct (C') comprising:  (a) a sense DNA strand essentially identical with at least part of the promoter region of an eC gene; and  (b) an antisense strand essentially, especially completely, complementary to (a);  (4) preparing genetically modified plants by introduction of an expression cassette that contains (C) or (C'); and  (5) (A) as new plants.</p> <p><b>ACTIVITY</b>  None given.</p> <p><b>MECHANISM OF ACTION</b>  None given.</p>	<p>DE 10238979-A+</p>

<p><u>USE</u> The genetically modified plants (A) are used to produce (I) and its precursors and/or downstream products, especially for preparation of carotenoid-containing extracts for use as food/feed supplements, e.g. for pigmentation of eggs, foods, feeds and fish, also, because of their antioxidant activity, for treatment of disease or as ornamental plants or as food/feed products.</p> <p><u>ADVANTAGE</u> The modified plants have a higher content of (I), and its precursors/products, relative to carotenoids of the <math>\alpha</math>-pathway, especially conversion of lycopene to <math>\alpha</math>-carotene is suppressed.</p> <p><u>EXAMPLE</u> The expression vector pS5A13 contains, in pSUN5, a cassette containing :  (a) the AP3P flower-specific promoter;  (b) sense DNA corresponding to the 5'-end of the <math>\epsilon</math>-cyclase (eC) gene;  (c) an intron;  (d) antisense DNA complementary to (b); and  (e) a terminator.</p>	<p>It was introduced into <i>Tagetes erecta</i> so that expression in the plant produced a double-stranded RNA that inhibited expression of eC. A typical transgenic plant produced flowers that contained (mg/g, fresh weight) lutein 35; <math>\beta</math>-carotene 13; zeaxanthin 4.4; violaxanthin 59 and total carotenoids 111; compare 260; 4.8; 2.7; 36 and 304 for flowers of wild-type plants.</p> <p><u>TECHNOLOGY FOCUS</u>  <u>Biotechnology</u> - Preferred Process: This comprises introducing into a plant the RNA as defined in (I), especially where the ds region contains a sequence that is identical with at least part of the endogenous eC transcript and includes the 5' or 3'-end of the plant's own eC-encoding nucleic acid. Especially the ds region comprises sense and antisense strands as in (C). The plants used for preparation of (I) are those with the lowest level of eC expression, and transcription of the ds eC RNA sequence is controlled by a flower-specific promoter.  Preferred Plants: These are specifically <i>Tagetes erecta</i> or <i>T. patula</i> but many other suitable genera and species are listed.  Preferred Materials: Intermediates and/or downstream products are lycopene; <math>\beta</math>-carotene; astaxanthin; canthaxanthin; echinenone</p>
	DE 10238979-A+1

2004-215841/21

(optionally 3- or 3'-hydroxy substituted); adonirubin; adonixanthin; antheraxanthin; violaxanthin; neoxanthin; capsorubin and capsanthin. In construct (C'), the cDNA sequence derived from the eC transcript is a 1830 base pairs (bp) sequence (4) and the sequence of the promoter region of the eC gene is a 358 bp sequence (13). In this construct, the two strands are linked covalently to form an inverted repeat and the sequence may be linked to a promoter.  
(53pp1251DwgNo.0/10)

DE 10238979-A/2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 102 38 979 A1 2004.02.26

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: 102 38 979.9  
(22) Anmeldetag: 20.08.2002  
(43) Offenlegungstag: 26.02.2004

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: A01H 5/00  
C12N 15/52

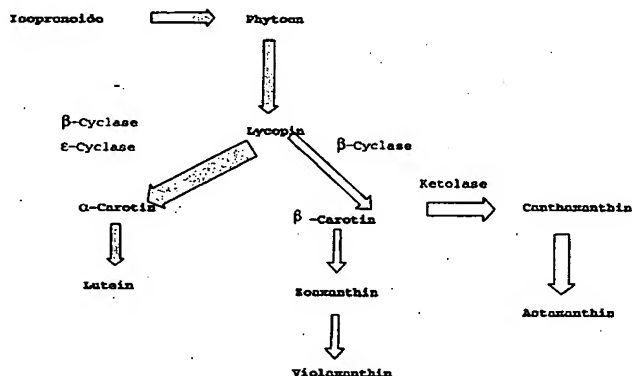
(71) Anmelder:  
SunGene GmbH & Co. KGaA, 06466 Gatersleben,  
DE

(72) Erfinder:  
Erfinder wird später genannt werden

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine durch doppelsträngige  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenzen verursachte reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen, die genetisch veränderten Pflanzen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Carotinoid-extrakten.



**Beschreibung**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen die im Vergleich zum Wildtyp eine durch doppelsträngige  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenzen verursachte reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen, die genetisch veränderten Pflanzen, sowie deren Verwendung als Nahrungs- und Futtermittel und zur Herstellung von Carotinoidextrakten.

[0002] Carotinoide, wie beispielsweise Lycopin, Latein,  $\beta$ -Carotin oder Zeaxanthin werden de novo in Bakterien, Algen, Pilzen und Pflanzen synthetisiert. Ketocarotinoide, also Carotinoide, die mindestens eine Keto-Gruppe enthalten, wie beispielsweise Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin sind natürliche Antioxidantien und Pigmente, die von einigen Algen und Mikroorganismen als Sekundärmetabolite produziert werden.

[0003] Aufgrund ihrer farbgebenden Eigenschaften werden die Carotinoide als Pigmentier- und Pigmentierhilfsstoffe eingesetzt. Zeaxanthin und Latein finden beispielsweise bei der Eidotterpigmentierung Verwendung,  $\beta$ -Carotin dient als Orange-Pigment in Lebensmitteln und Getränken, Astaxanthin wird als Pigmentierhilfsstoff in der Tierernährung, insbesondere in der Forellen-, Lachs- und Shrimpszucht verwendet.

[0004] Darüber hinaus finden die Carotinoide, wie beispielsweise Latein, Zeaxanthin, Lycopin,  $\beta$ -Carotin und Astaxanthin, aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften Anwendung bei der Supplementierung in der Human- und Tierernährung zur Therapie und Vorbeugung von Krankheiten.

[0005] Ein wirtschaftliches, biotechnologisches Verfahren zur Herstellung von natürlichen Carotinoiden ist von großer Bedeutung.

[0006] Aus WO 00/32788 ist es bekannt durch kombinierte Überexpression von Carotinoid-Biosynthesegenen und Antisense-Verfahren bestimmte Carotinoidverhältnisse in Tagetespetalen zu beeinflussen.

[0007] Das in WO 00/32788 offenbarte Verfahren liefert zwar genetisch veränderte Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp einen veränderten Gehalt an Carotinoiden aufweisen, weist jedoch den Nachteil auf, dass die Höhe des Gehalts an Carotinoiden des " $\beta$ -Carotinoid-Weges", wie beispielsweise  $\beta$ -Carotin oder Zeaxanthin und die Reinheit dieser Carotinoide und damit das Verhältnis an Carotinoiden des " $\beta$ -Carotinoid-Weges", wie beispielsweise  $\beta$ -Carotin oder Zeaxanthin zu den Carotinoiden des " $\alpha$ -Carotinoid-Weges", wie beispielsweise  $\alpha$ -Carotin oder Lutein noch nicht zufriedenstellend ist.

[0008] Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde ein alternatives Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von Pflanzen zur Verfügung zu stellen, bzw. weitere transgene Pflanzen, die Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten herstellen, zur Verfügung zu stellen, die optimierte Eigenschaften, wie beispielsweise einen höheren Gehalt an Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten im Verhältnis zu Carotinoiden des " $\alpha$ -Carotinoid-Weges" aufweisen und den geschilderten Nachteil des Standes der Technik nicht aufweisen.

[0009] Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen gefunden, die im Vergleich zum Wildtyp eine durch doppelsträngige  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenzen verursachte reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

[0010] Unter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer  $\epsilon$ -Cyclase verstanden.

[0011] Unter einer  $\epsilon$ -Cyclase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, einen endständigen, linearen Rest von Lycopin in einen  $\epsilon$ -Ionon-Ring zu überführen.

[0012] Unter einer  $\epsilon$ -Cyclase wird daher insbesondere ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Lycopin in  $\delta$ -Carotin umzuwandeln.

[0013] Dementsprechend wird unter  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\epsilon$ -Cyclase umgesetzte Menge Lycopin bzw. gebildete Menge  $\delta$ -Carotin verstanden.

[0014] Bei einer reduzierten  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein  $\epsilon$ -Cyclase die umgesetzte Menge Lycopin bzw. die gebildete Menge  $\delta$ -Carotin reduziert.

[0015] Unter einer reduzierten  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität wird vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität einer  $\epsilon$ -Cyclase in einer pflanzlichen Zelle, Pflanze oder einem davon abgeleiteten Teil, Gewebe, Organ, Zellen oder Samen verstanden.

[0016] Die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in Pflanzen gegenüber dem Wildtyp kann beispielsweise durch Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Proteinmenge, oder der  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA-Menge in der Pflanze erfolgen. Dementsprechend kann eine gegenüber dem Wildtyp reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität direkt bestimmt werden oder über die Bestimmung der  $\epsilon$ -Cyclase-Proteinmenge oder der  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA-Menge der erfindungsgemäßen Pflanze im Vergleich zum Wildtyp erfolgen.

[0017] Eine Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung einer  $\epsilon$ -Cyclase

bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der  $\epsilon$ -Cyclase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit der  $\epsilon$ -Cyclase). Vorzugsweise wird die  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität (bzw. die  $\epsilon$ -Cyclase-Proteinmenge oder die  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA-Menge) in der Pflanze, besonders bevorzugt in Blüten im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5%, weiter bevorzugt um mindestens 20%, weiter bevorzugt um mindestens 50%, weiter bevorzugt um 100% reduziert. Insbesondere meint „Reduzierung“ auch das vollständigen Fehlen der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität (bzw. des  $\epsilon$ -Cyclase-Proteins oder der  $\epsilon$ -Cyclase-mRNA).

[0018] Die Bestimmung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt vorzugsweise unter folgenden Bedingungen:

Die  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität kann nach Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9–15) in vitro bestimmt werden, wenn zu einer bestimmten Menge an Pflanzenextrakt Kaliumphosphat als Puffer (pH 7.6), Lycopin als Substrat, Stromaprotein von Paprika, NADP<sup>+</sup>, NADPH und ATP zugegeben werden.

[0019] Die Bestimmung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen und in Wildtyp- bzw. Referenzpflanzen erfolgt besonders bevorzugt nach Bouvier, d'Harlingue und Camara (Molecular Analysis of carotenoid cyclase inhibition; Arch. Biochem. Biophys. 346(1) (1997) 53–64):

Der in-vitro Assay wird in einem Volumen von 0.25 ml durchgeführt. Der Ansatz enthält 50 mM Kaliumphosphat (pH 7.6), unterschiedliche Mengen an Pflanzenextrakt, 20 nM Lycopin, 0.25 mg an chromoplastidärem Stroma-protein aus Paprika, 0.2 mM NADP<sup>+</sup>, 0.2 mM NADPH und 1 mM ATP. NADP/NADPH und ATP werden in 0.01 ml Ethanol mit 1 mg Tween 80 unmittelbar vor der Zugabe zum Inkubationsmedium gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 60 Minuten bei 30°C wird die Reaktion durch Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1) beendet. Die in Chloroform extrahierten Reaktionsprodukte werden mittels HPLC analysiert.

[0020] Ein alternativer Assay mit radioaktivem Substrat ist beschrieben in Fraser und Sandmann (Biochem. Biophys. Res. Comm. 185(1) (1992) 9–15). Eine weitere analytische Methode ist beschrieben in Beyer, Kröncke und Nievelstein (On the mechanism of the lycopene isomerase/cyclase reaction in *Narcissus pseudonarcissus* L. chromoplast; J. Biol. Chem. 266(26) (1991) 17072–17078).

[0021] Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff „Pflanze“ die Ausgangspflanze (Wildtyp) oder eine erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanze oder beides verstanden werden.

[0022] Vorzugsweise und insbesondere in Fällen in denen die Pflanze oder der Wildtyp nicht eindeutig zuordnenbar ist, wird unter „Wildtyp“ für die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität und die Erhöhung des Gehalts an Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten eine Referenzpflanze verstanden.

[0023] Diese Referenzpflanze ist *Tagetes erecta*, *Tagetes patula*, *Tagetes lucida*, *Tagetes pringlei*, *Tagetes palmeri*, *Tagetes minuta* oder *Tagetes campanulata*, besonders bevorzugt *Tagetes erecta*.

[0024] Im erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität durch Einbringen mindestens einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz, nachstehend auch  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA genannt, oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette oder Expressionskassetten in Pflanzen.

[0025] Umfasst sind solche Verfahren, bei denen die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA gegen ein  $\epsilon$ -Cyclase-Gen (also genomische DNA-Sequenzen wie die Promotorsequenz) oder ein  $\epsilon$ -Cyclase-Transkript (also mRNA-Sequenzen) gerichtet ist.

[0026] Unter genetisch veränderten Pflanzen die im Vergleich zum Wildtyp eine durch doppelsträngige  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenzen verursachte reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen, wird erfindungsgemäß verstanden, dass die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität durch die Verwendung von doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenzen erfolgt. Dieses Verfahren der Genregulation mittels doppelsträngiger RNA („double-stranded RNA interference“, auch als dsRNA-Verfahren bezeichnet) ist an sich bekannt und beispielsweise in Matzke MA et al. (2000) Plant Mol Biol 43:401–415; Fire A. et al (1998) Nature 391:806–811; WO 99/32619; WO 99/53050; WO 00/68374; WO 00/44914; WO 00/44895; WO 00/49035 oder WO 00/63364 beschrieben. Auf die in den angegebenen Zitaten beschriebenen Verfahren und Methoden wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

[0027] Unter „Doppelsträngiger Ribonukleinsäuresequenz“ wird erfindungsgemäß eine oder mehr Ribonukleinsäuresequenzen, die aufgrund komplementärer Sequenzen theoretisch, beispielsweise gemäß den Basenpaarregeln von Watson und Crick und/oder faktisch, beispielsweise aufgrund von Hybridisierungsexperimenten, in vitro und/oder in vivo in der Lage sind, doppelsträngige RNA-Strukturen auszubilden.

[0028] Dem Fachmann ist bewußt, dass die Ausbildung von doppelsträngigen RNA-Strukturen, einen Gleichgewichtszustand darstellt. Bevorzugt ist das Verhältnis von doppelsträngigen Molekülen zu entsprechenden dissoziierten Formen mindestens 1 zu 10, bevorzugt 1:1, besonders bevorzugt 5:1, am meisten bevorzugt 10:1.

[0029] Unter einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz oder auch  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA wird vorzugsweise ein RNA-Molekül verstanden, das einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

[0030] Im erfindungsgemäßen Verfahren bringt man daher zur Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität bevorzugt in die Pflanze eine RNA ein, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

[0031] Unter dem Begriff „ $\epsilon$ -Cyclase-Transkript“ wird der transkribierte Teil eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens verstanden, der neben der  $\epsilon$ -Cyclase kodierenden Sequenz beispielsweise auch nichtkodierende Sequenzen, wie beispielsweise auch UTRs enthält.

[0032] Unter einer RNA, die „mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist“, ist vorzugsweise gemeint, dass die RNA-Sequenz mit mindestens einem Teil des theoretischen Transkriptes der  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz, also der entsprechenden RNA-Sequenz, identisch ist.

[0033] Unter „einem Teil“ des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts bzw. der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz werden Teilsequenzen verstanden, die von wenigen Basenpaaren bis hin zu vollständigen Sequenzen des Transkripts bzw. der Promotorsequenz reichen können. Die optimale Länge der Teilsequenzen kann der Fachmann durch Routineversuche leicht ermitteln.

[0034] In der Regel beträgt die Länge der Teilsequenzen mindestens 10 Basen und höchstens 2 kb, bevorzugt mindestens 25 Basen und höchstens 1,5 kb, besonders bevorzugt mindestens 50 Basen und höchstens 600 Basen, ganz besonders bevorzugt mindestens 100 Basen und höchstens 500, am meisten bevorzugt mindestens 200 Basen oder mindestens 300 Basen und höchstens 400 Basen.

[0035] Vorzugsweise werden die Teilsequenzen so ausgesucht, dass eine möglichst hohe Spezifität erreicht wird und nicht Aktivitäten anderer Enzyme reduziert werden, deren Verminderung nicht erwünscht ist. Es ist daher vorteilhaft für die Teilsequenzen der  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA Teile des  $\epsilon$ -Cyclase Transkripts und/oder Teilsequenzen der  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenzen zu wählen, die nicht in anderen Sequenzen auftreten.

[0036] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält daher die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA eine Sequenz, die mit einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, codierend eine  $\epsilon$ -Cyclase, enthält. Insbesondere sind nichttranslatierte Bereiche im 5' oder 3' des Transkriptes geeignet, selektive Doppel-Strang-Strukturen herzustellen.

[0037] Ein weiterer Gegenstand der Erfindung bezieht sich auf doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA-Moleküle), die bei Einbringen in einen pflanzlichen Organismus (oder eine davon abgeleitete Zelle, Gewebe, Organ oder Vermehrungsmaterial) die Verminderung einer  $\epsilon$ -Cyclase bewirken.

[0038] Ein doppelsträngiges RNA-Molekül zur Reduzierung der Expression einer  $\epsilon$ -Cyclase ( $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA) umfasst dabei bevorzugt

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil eines "sense"-RNA- $\epsilon$ -Cyclase Transkriptes, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen, bevorzugt vollständig, komplementären ist.

[0039] In Bezug auf die dsRNA-Moleküle wird unter  $\epsilon$ -Cyclase-Nukleinsäuresequenz, bzw. das entsprechende Transkript bevorzugt die Sequenz gemäß SEQ. ID. NO. 4 oder ein Teil derselben verstanden.

[0040] "Im wesentlichen identisch" meint, dass die dsRNA Sequenz auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu der  $\epsilon$ -Cyclase Zielsequenz aufweisen kann und dennoch eine effizient Verminderung der Expression bewirkt. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 75%, bevorzugt mindestens 80%, ganz besonders bevorzugt mindestens 90% am meisten bevorzugt 100% zwischen dem "sense"-Strang einer inhibitorischen dsRNA und mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, bzw. zwischen dem "antisense"-Strang dem komplementären Strang eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens.

[0041] Eine 100 %ige Sequenzidentität zwischen dsRNA und einem  $\epsilon$ -Cyclase Gentranskript ist nicht zwingend erforderlich, um eine effiziente Verminderung der  $\epsilon$ -Cyclase Expression zu bewirken. Demzufolge besteht der Vorteil, dass das Verfahren tolerant ist gegenüber Sequenzabweichungen, wie sie infolge genetischer Mutationen, Polymorphismen oder evolutionärer Divergenzen vorliegen können. So ist es beispielsweise möglich mit der dsRNA, die ausgehend von der  $\epsilon$ -Cyclase Sequenz des einen Organismus generiert wurde, die  $\epsilon$ -Cyclase Expression in einem anderen Organismus zu unterdrücken. Zu diesem Zweck umfasst die dsRNA bevorzugt Sequenzbereiche von  $\epsilon$ -Cyclase-Gentranskripten, die konservierten Bereichen entsprechen. Besagte konservierte Bereiche können aus Sequenzvergleichen leicht abgeleitet werden.

[0042] Alternativ, kann eine "im wesentlichen identische" dsRNA auch als Nukleinsäuresequenz definiert werden, die befähigt ist, mit einem Teil eines  $\epsilon$ -Cyclase Gentranskriptes zu hybridisieren beispielsweise in 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA bei 50°C oder 70°C für 12 bis 16 h).

[0043] "Im wesentlichen komplementär" meint, dass der "antisense"-RNA-Strang auch Insertionen, Deletionen sowie einzelne Punktmutationen im Vergleich zu dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges aufweisen kann. Bevorzugt beträgt die Homologie mindestens 80%, bevorzugt mindestens 90%, ganz besonders bevor-



zugt mindestens 95%, am meisten bevorzugt 100 zwischen dem "antisense"-RNA-Strang und dem Komplement des "sense"-RNA-Stranges.

[0044] Zur Transformation der Pflanze mit einer  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA wird bevorzugt ein Nukleinsäurekonstrukt verwendet, das in die Pflanze eingebracht wird und das in der Pflanze in die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA transkribiert wird.

[0045] Daher betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Nukleinsäurekonstrukt, transkribierbar in

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA- $\epsilon$ -Cyclase Transkriptes, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen – bevorzugt vollständig – komplementär ist.

[0046] Diese Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch Expressionskassetten oder Expressionsvektoren genannt.

[0047] In einer weiteren Ausführungsform umfaßt die  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA-Transkriptes des Promotorbereichs eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen – bevorzugt vollständig – komplementären ist.

[0048] Vorzugsweise wird unter dem Promotorbereich einer  $\epsilon$ -Cyclase eine Sequenz gemäß SEQ. ID. NO. 13 oder ein Teil der selben verstanden.

[0049] Das entsprechende, bevorzugt zur Transformation der Pflanzen zu verwendende, Nukleinsäurekonstrukt, umfasst

- a) einen "sense"-DNA-Strang der im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des Promotorbereichs eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, und
- b) einen "antisense"-DNA-Strang, der zu dem DNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen – bevorzugt vollständig – komplementär ist.

[0050] Zur Herstellung der  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen und insbesondere deren Expressionskassetten zur Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität werden, insbesondere für *Tapetes erecta*, besonders bevorzugt die folgenden Teil-Sequenzen verwendet:

SEQ. ID. NO. 6: Sense-Fragment der 5'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

SEQ. ID. No. 7: Antisense-Fragment der 5'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

SEQ. ID. No. 8: Sense-Fragment der 3'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

SEQ. ID. No. 9: Antisense-Fragment der 3'terminalen Region der  $\epsilon$ -Cyclase

SEQ. ID. No. 13: Sense-Fragment des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors

SEQ. ID. No. 14: Antisense-Fragment des  $\epsilon$ -Cyclase-Promotors

[0051] Die dsRNA kann aus einem oder mehr Strängen von Polyribonukleotiden bestehen. Natürlich können, um den gleichen Zweck zu erreichen, auch mehrere individuelle dsRNA Moleküle, die jeweils einen der oben definierten Ribonukleotidsequenzabschnitte umfassen, in die Zelle oder den Organismus eingebracht werden.

[0052] Die doppelsträngige dsRNA-Struktur kann ausgehend von zwei komplementären, separaten RNA-Strängen oder – bevorzugt – ausgehend von einem einzelnen, selbstkomplementären RNA-Strang gebildet werden. In diesem Fall sind "sense"-RNA-Strang und "antisense"-RNA-Strang bevorzugt kovalent in Form eines invertierten "Repeats" miteinander verbunden.

[0053] Wie z.B. in WO 99/53050 beschrieben, kann die dsRNA auch eine Haarnadelstruktur umfassen, indem "sense"- und "antisense"-Strang durch eine verbindende Sequenz ("Linker"; beispielsweise ein Intron) verbunden werden. Die selbstkomplementären dsRNA-Strukturen sind bevorzugt, da sie lediglich die Expression einer RNA-Sequenz erfordern und die komplementären RNA-Stränge stets in einem äquimolaren Verhältnis umfassen. Bevorzugt ist die verbindende Sequenz ein Intron (z.B. ein Intron des ST-LS1 Gens aus Kartoffel; Vancanneyt GF et al. (1990) Mol Gen Genet 220(2): 245–250).

[0054] Die Nukleinsäuresequenz kodierend für eine dsRNA kann weitere Elemente beinhalten, wie beispielsweise Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale.

[0055] Ist die dsRNA jedoch gegen die Promotorsequenz einer  $\epsilon$ -Cyclase gerichtet, so umfaßt sie bevorzugt keine Transkriptionsterminationssignale oder Polyadenylierungssignale. Dies ermöglicht eine Retention der dsRNA im Nukleus der Zelle und verhindert eine Verteilung der dsRNA in der gesamten Pflanze „Spreading“).

[0056] Sollen die zwei Stränge der dsRNA in einer Zelle oder Pflanze zusammengebracht werden, so kann dies beispielhaft auf folgende Art geschehen:

- a) Transformation der Zelle oder Pflanze mit einem Vektor, der beide Expressionskassetten umfasst,
- b) Kotretransformation der Zelle oder Pflanze mit zwei Vektoren, wobei der eine die Expressionskassetten mit

dem "sense"-Strang, der andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

c) Kreuzung von zwei individuellen Pflanzenlinien, wobei die eine die Expressionskassetten mit dem "sense"-Strang, die andere die Expressionskassetten mit dem "antisense"-Strang umfasst.

[0057] Die Bildung der RNA Duplex kann entweder außerhalb der Zelle oder innerhalb derselben initiiert werden.

[0058] Die dsRNA kann entweder in vivo oder in vitro synthetisiert werden. Dazu kann eine DNA-Sequenz kodierend für eine dsRNA in eine Expressionskassette unter Kontrolle mindestens eines genetischen Kontrollelementes (wie beispielsweise einem Promotor) gebracht werden. Eine Polyadenylierung ist nicht erforderlich, ebenso müssen keine Elemente zur Initiierung einer Translation vorhanden sein. Bevorzugt ist die Expressionskassette für die MP-dsRNA auf dem Transformationskonstrukt oder dem Transformationsvektor enthalten.

[0059] In einer bevorzugten Ausführungsform werden genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die geringste Expressionsrate einer  $\epsilon$ -Cyclase aufweisen.

[0060] Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität blütenspezifisch, besonders bevorzugt blütenblattspezifisch erfolgt.

[0061] In der vorstehend beschriebenen, besonders bevorzugten Ausführungsform wird dies dadurch erreicht, dass die Transkription der  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA-Sequenzen unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors oder noch bevorzugter unter Kontrolle eines blütenblattspezifischen Promotors erfolgt.

[0062] In einer besonders bevorzugten -Ausführungsform erfolgt daher die Expression der dsRNA ausgehend von einem Expressionskonstrukt unter funktioneller Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors, besonders bevorzugt unter der Kontrolle des Promotors beschrieben durch SEQ. ID. NO. 10 oder eines funktionell äquivalenten Teils desselben.

[0063] Die Expressionskassetten kodierend für den "antisense"- und/oder den "sense"-Strang einer  $\epsilon$ -Cyclase-dsRNA oder für den selbstkomplementären-Strang der dsRNA, werden dazu bevorzugt in einen Transformationsvektor inseriert und mit den unten beschriebenen Verfahren in die pflanzliche Zelle eingebracht. Für das erfindungsgemäße Verfahren ist eine stabile Insertion in das Genom vorteilhaft.

[0064] Die dsRNA kann in einer Menge eingeführt werden, die zumindest eine Kopie pro Zelle ermöglicht. Höhere Mengen (z.B. mindestens 5, 10, 100, 500 oder 1000 Kopien pro Zelle) können ggf. eine effizienter Verminderung bewirken.

[0065] Die Methoden der dsRNA, der Kosuppression mittels sense-RNA und der "VIGS" ("virus induced gene silencing") werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) oder transcriptional gene silencing" (TGS) bezeichnet.

[0066] In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.

[0067] Besonders bevorzugt verwendet man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Cucurbita, Cytisus, Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Eschscholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevilla, Helenium, Helianthus, Hepatica, Helleborus, Hibiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leontodon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Marattia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia verwendet.

[0068] Ganz besonders bevorzugt verwendet man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzenarten Marigold, Tagetes erecta oder Tagetes patula.

[0069] Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, ein Ernten der Pflanzen und ein Isolieren von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten aus der Pflanze, besonders bevorzugt aus den Blütenblättern der Pflanzen angeschlossen.

[0070] Die transgenen Pflanzen werden in an sich bekannter Weise auf Nährböden gezogen und entsprechend geerntet.

[0071] Die Isolierung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten aus den geernteten Blütenblättern erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch-Trocknung und anschließender Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemischer oder physikalischer Reinigungsprozesse,

wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie. Die Isolierung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten aus den Blütenblättern erfolgt beispielsweise bevorzugt durch organische Lösungsmittel wie Aceton, Hexan, Ether oder tert.-Methylbutylether. [0072] Weitere Isolierverfahren von Ketocarotinoiden, insbesondere aus Blütenblättern, sind beispielsweise in Egger und Kleinig (Phytochemistry (1967) 6, 437–440) und Egger (Phytochemistry (1965) 4, 609–618) beschrieben.

[0073] Vorzugsweise sind die biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten von Zeaxanthin ausgewählt aus der Gruppe Lycopin,  $\beta$ -Carotin, Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin und Adonixanthin, Violaxanthin, Antheraxanthin, Neoxanthin, Capsorubin, Capsanthin.

[0074] Unter biosynthetischen Zwischenprodukten von Zeaxanthin werden Carotinoide verstanden, die im Biosyntheseschema auf dem biochemischen Weg zu Zeaxanthin liegen. Vorzugsweise sind diese Zwischenprodukte Lycopin und/oder  $\beta$ -Carotin.

[0075] Unter biosynthetischen Folgeprodukten von Zeaxanthin werden Carotinoide verstanden, die im Biosyntheseschema von Zeaxanthin ableiten, wie beispielsweise Antheraxanthin, Violaxanthin und Neoxanthin. Unter biosynthetischen Folgeprodukten von Zeaxanthin werden aber auch insbesondere solche Carotinoide verstanden, die sich beispielsweise durch Einbringen weiterer enzymatischer Aktivitäten in die Pflanze biosynthetisch von Zeaxanthin und dessen Zwischenprodukten ableiten lassen.

[0076] Beispielsweise kann durch Verursachung einer Ketolase-Aktivität in genetisch veränderten Pflanzen, beispielsweise durch Einbringen von Nukleinsäuren kodierend eine Ketolase in eine Ausgangspflanzen, die genetisch veränderte Pflanze in die Lage versetzt werden, ausgehend von Carotinoiden des  $\beta$ -Carotinoid-Weges, wie beispielsweise  $\beta$ -Carotin oder Zeaxanthin, Ketocarotinoide wie beispielsweise Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin oder Adonixanthin herzustellen.

[0077] Unter biosynthetischen Folgeprodukten von Zeaxanthin werden daher auch insbesondere Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin oder Adonixanthin verstanden.

[0078] Ein besonders bevorzugtes Folgeprodukt von Zeaxanthin ist Astaxanthin.

[0079] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass man Expressionskassetten, enthaltend ein vorstehend beschriebenes Nukleinsäurekonstrukt in eine Ausgangspflanze einführt.

[0080] Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

[0081] Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, sowie die transgenen Pflanzen selbst beschrieben.

[0082] Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693–8711).

[0083] Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann.

[0084] "Konstitutiver" Promotor meint solche Promotoren, die eine Expression in zahlreichen, bevorzugt allen, Geweben über einen größeren Zeitraum der Pflanzenentwicklung, bevorzugt zu allen Zeitpunkten der Pflanzenentwicklung, gewährleisten.

[0085] Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der Promotor des 35S-Transkriptes des CaMV Blumenkohlmosaikvirus (Franck et al. (1980) Cell 21:285–294; Odell et al. (1985) Nature 313:810–812; Shewmaker et al. (1985) Virology 140:281–288; Gardner et al. (1986) Plant Mol Biol 6:221–228) oder der 19S CaMV Promotor (US 5,352,605; WO 84/02913; Benfey et al. (1989) EMBO J 8:2195–2202).

[0086] Ein weiterer geeigneter konstitutiver Promotor ist der pds Promotor (Pecker et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci USA 89: 4962–4966) oder der "Rubisco small subunit (SSU)"-Promotor (US 4,962,028), der Legu-

- minB-Promotor (GenBank Acc.-Nr. X03677), der Promotor der Nopalinsynthese aus *Agrobacterium*, der TR-Doppelpromotor, der OCS (Octopin Synthase) Promotor aus *Agrobacterium*, der Ubiquitin Promotor (Holtorf S et al. (1995) *Plant Mol Biol* 29:637–649), den Ubiquitin 1 Promotor (Christensen et al. (1992) *Plant Mol Biol* 18:675–689; Bruce et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9692–9696), den Smas Promotor, den Cinnamylalkoholdehydrogenase-Promotor (US 5,683,439), die Promotoren der vakuolären ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines prolinreichen Proteins aus Weizen (WO 91/13991), der Pnit-Promoter (Y07648.L, Hillebrand et al. (1998), *Plant. Mol. Biol.* 36, 89–99, Hillebrand et al. (1996), *Gene*, 170, 197–200) sowie weitere Promotoren von Genen, deren konstitutive Expression in Pflanzen dem Fachmann bekannt ist.
- [0087] Die Expressionskassetten können auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten (Übersichtsartikel: Gatz et al. (1997) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48:89–108), durch den die Expression des Ketolase-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren, wie z.B. der PRP1 Promotor (Ward et al. (1993) *Plant Mol Biol* 22:361–366), durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzolsulfonamid-induzierbarer Promotor (EP 0 388 186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) *Plant J* 2:397–404), ein durch Abscisinsäure induzierbarer Promotor (EP 0 335 528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer Promotor (WO 93/21334) können ebenfalls verwendet werden.
- [0088] Ferner sind Promotoren bevorzugt, die durch biotischen oder abiotischen Stress induziert werden wie beispielsweise der pathogen-induzierbare Promotor des PRP1-Gens (Ward et al. (1993) *Plant Mol Biol* 22:361–366), der hitzeinduzierbare hsp70- oder hsp80-Promoter aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare alpha-Amylase Promoter aus der Kartoffel (WO 96/12814), der licht-induzierbare PPDK Promotor oder der verwundungsinduzierte pinII-Promoter (EP375091).
- [0089] Pathogen-induzierbare Promotoren umfassen die von Genen, die infolge eines Pathogenbefalls induziert werden wie beispielsweise Gene von PR-Proteinen, SAR-Proteinen, b-1,3-Glucanase, Chitinase usw. (beispielsweise Redolfi et al. (1983) *Neth J Plant Pathol* 89:245–254; Uknes, et al. (1992) *The Plant Cell* 4:645–656; Van Loon (1985) *Plant Mol Biol* 4:111–116; Marineau et al. (1987) *Plant Mol Biol* 9:335–342; Matton et al. (1987) *Molecular Plant-Microbe Interactions* 2:325–342; Somssich et al. (1986) *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2427–2430; Somssich et al. (1988) *Mol Gen Genetics* 2:93–98; Chen et al. (1996) *Plant J* 10:955–966; Zhang and Sing (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2507–2511; Warner, et al. (1993) *Plant J* 3:191–201; Siebertz et al. (1989) *Plant Cell* 1:961–968(1989).
- [0090] Umfasst sind auch verwundungs-induzierbare Promotoren wie der des pinII Gens (Ryan (1990) *Ann Rev Phytopath* 28:425–449; Duan et al. (1996) *Nat Biotech* 14:494–498), des wun1 und wun2-Gens (US 5,428,148), des win1- und win2-Gens (Stanford et al. (1989) *Mol Gen Genet* 215:200–208), des Systemin (McGurl et al. (1992) *Science* 225:1570–1573), des WIP1-Gens (Rohmeier et al. (1993) *Plant Mol Biol* 22:783–792; Ekelkamp et al. (1993) *FEBS Letters* 323:73–76), des MPI-Gens (Corderok et al. (1994) *The Plant J* 6(2):141–150) und dergleichen.
- [0091] Weitere geeignete Promotoren sind beispielsweise Fruchtreifungsspezifische Promotoren, wie beispielsweise der Fruchtreifungsspezifische Promotor aus Tomate (WO 94/21794, EP 409 625). Entwicklungsabhängige Promotoren schließt zum Teil die Gewebespezifischen Promotoren ein, da die Ausbildung einzelner Gewebe naturgemäß entwicklungsabhängig erfolgt.
- [0092] Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Ketocarotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Bevorzugt sind beispielsweise Promotoren mit Spezifitäten für die Antheren, Ovarien, Petalen, Sepalen, Blüten, Blätter, Stengel und Wurzeln und Kombinationen hieraus.
- [0093] Knollen-, Speicherwurzel- oder Wurzel-spezifische Promotoren sind beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33) oder der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel.
- [0094] Blattspezifische Promotoren sind beispielsweise der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO 97/05900), der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase) oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al. (1989) *EMBO J* 8:2445–2451).
- [0095] Blütenspezifische Promotoren sind beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO 92/16635), der Promotor des P-rr Gens (WO 98/22593) oder besonders bevorzugt die modifizierte Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298–10200; Hill et al. (1998) *Development* 125: 1711–1721).
- [0096] Antheren-spezifische Promotoren sind beispielsweise der 5126-Promotor (US 5,689,049, US 5,689,051), den glob-1 Promotor oder der g-Zein Promotor.
- [0097] Weitere zur Expression in Pflanzen geeignete Promotoren sind beschrieben in Rogers et al. (1987) *Meth in Enzymol* 153:253–277; Schardl et al. (1987) *Gene* 61:1–11 und Berger et al. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8402–8406).
- [0098] Alle in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Promotoren ermöglichen in der Regel die Expression der doppelsträngige  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenzen in den erfindungsgemäßen Pflanzen.
- [0099] Besonders bevorzugt im erfindungsgemäßen Verfahren und in den erfindungsgemäßen genetisch ver-

änderten Pflanzen sind blütenspezifische Promotoren.

[0100] Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer vorstehend beschriebenen, eine doppelsträngige  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz transkripiierende, Nukleinsäuresequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein plastidenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L. W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind. Die vorzugsweise inserierte Nukleinsäure kodierend ein plastidäres Transitpeptid, gewährleisten die Lokalisation in Plastiden und insbesondere in Chromoplasten.

[0101] Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco (rbcS) oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem Äquivalent abgeleitet ist.

[0102] Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Kodon in der NcoI Schnittstelle:

#### pTP09

```
KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA
ATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGGGA
TCC_BamHI
```

#### pTP10

```
KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA
ATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGGTC
GATCC_BamHI
```

#### pTP11

```
KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA
ATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGGGG
ATCC_BamHI
```

[0103] Weitere Beispiele für ein plastidäres Transitpeptid sind das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana* und das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Ribulosebiphosphat Carboxylase (rbcS) aus Erbse (Guerineau, F, Woolston, S, Brooks, L, Mullineaux, P (1988) An expression cassette for targeting foreign proteins into the chloroplasts. Nucl. Acids res. 16: 11380).

[0104] Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

[0105] Beispiele für einen Terminator sind der 35S-Terminator (Guerineau et al. (1988) Nucl Acids Res. 16: 11380), der nos Terminator (Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase:

transcript mapping and DNA sequence. J Mol Appl Genet. 1982; 1(6):561–73) oder der ocs Terminator (Gielen, J, de Beuckeleer, M, Seurinck, J, Debroek, H, de Greve, H, Lemmers, M, van Montagu, M, Schell, J (1984) The complete sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiRch5. EMBO J. 3: 835–846).

[0106] Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können in vitro-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

[0107] Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewingback" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

[0108] Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

[0109] Die Übertragung von Nukleinsäuresequenzen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.

[0110] Dazu können an sich bekannte Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.

[0111] Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone – die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch *Agrobacterium* vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128–143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205–225 beschrieben.

[0112] Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711) oder besonders bevorzugt pSUN2, pSUN3, pSUN4 oder pSUN5 (WO 02/00900).

[0113] Mit einer Expressionskassette transformierte *Agrobakterien* können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer *Agrobakterien*-lösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

[0114] Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette in einen Vektor, beispielsweise pBin19 oder insbesondere pSUN5 kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren.

[0115] Mit einem solchen Vektor transformierte *Agrobakterien* können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer *Agrobakterien*-lösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

[0116] Die Transformation von Pflanzen durch *Agrobakterien* ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15–38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure kodierend eine Ketolase enthalten.

[0117] Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71–119 (1993) beschrieben.

[0118] Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pJIT117 (Guerineau et al. (1988) Nucl. Acids Res. 16:11380), pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in *Agrobakterien* replizieren können.

[0119] Die Erfindung betrifft ferner die genetisch veränderten Pflanzen, die im Vergleich zum Wildtyp eine durch doppelsträngige  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenzen verursachte reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

[0120] Wie vorstehend erwähnt, enthält die genetisch veränderte Pflanze in einer bevorzugten Ausführungsform eine RNA, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder



b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

[0121] Bevorzugte, genetisch veränderte Pflanze sind ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Iliaceae oder Lamiaceae.

[0122] Besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanzen sind ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Cucurbita, Cytisus, Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotoca, Doronicum, Escholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevilla, Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hibiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leon-todon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia.

[0123] Ganz besonders bevorzugte, genetisch veränderte Pflanze sind ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes erecta oder Tagetes patula.

[0124] Die transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile, insbesondere deren Blütenblätter sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

[0125] Die genetisch veränderten Pflanzen können, wie vorstehend beschrieben, zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten, insbesondere zur Herstellung von Lycopin,  $\beta$ -Carotin, Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin oder Adonixanthin und insbesondere zur Herstellung von Astaxanthin verwendet werden.

[0126] Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Pflanzen weisen im Vergleich zum Wildtyp einen erhöhten Gehalt mindestens eines Carotinoids auf, ausgewählt aus der Gruppe Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten.

[0127] Unter einem erhöhten Gehalt wird in diesem Fall auch ein verursachter Gehalt an Ketocarotinoiden, bzw. Astaxanthin verstanden.

[0128] Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten können auch beispielsweise direkt oder nach an sich bekannter Prozessierung als Nahrungsmittel oder Futtermittel oder als Futter- und Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden. Ferner können die genetisch veränderten Pflanzen zur Herstellung von Carotinoidhaltigen Extrakten der Pflanzen und/oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmitteln verwendet werden.

[0129] Die genetisch veränderten Pflanzen können auch als Zierpflanzen im Horticulture-Bereich verwendet werden.

[0130] Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

#### Allgemeine Experimentelle Bedingungen:

##### Sequenzanalyse rekombinanter DNA

[0131] Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463–5467).

Beispiel 1: Herstellung eines Klonierungsvektors zur Herstellung von doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenz-Expressionskassetten für die blütenspezifischen Expression von Epsilon-cyclase dSRNAS in *Tagetes erecta*

[0132] Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Fragmenten der Epsilon-Cyclase in *Tagetes erecta* erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus *Arabidopsis thaliana* (AL132971: Nukleotidregion 9298–10200; Hill et al. (1998) Development 125: 1711–1721)

[0133] Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Fragment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Fragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron, das PIV2 Intron des ST-LH1 Genes aus Kartoffel (Vancanneyt G. et al. (1990) Mol Gen Genet 220: 245–50) mit einander verbunden sind.

[0134] Die cDNA, die für den AP3 Promoter (–902 bis +15) aus *Arabidopsis thaliana* kodiert, wurde mittels PCR unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Arabidopsis thaliana* isoliert) und der Primer PR7 (SEQ ID No. 15) und PR10 (SEQ ID No. 18) hergestellt.

[0135] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der DNA, die das AP3-Promoterfragment (–902 bis +15) kodiert, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl genomischer DNA aus *A.thaliana* (1:100 wird hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR7 (SEQ ID No. 15)
- 0,2 mM PR10 (SEQ ID No. 18)
- 5 µl 10 × PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 µl Pfu Polymerase (Stratagene)
- 28,8 µl Aq. Dest.

[0136] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	50°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

[0137] Das 922 Bp Amplifikat wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR 2.1 (Invitrogen) kloniert und das Plasmid pTAP3 erhalten. Sequenzierung des Klon pTAP3 bestätigte eine Sequenz, die sich lediglich in durch eine Insertion (ein G in Position 9765 der Sequenz AL132971) und einen Basenaustausch (ein G statt ein A in Position 9726 der Sequenz AL132971) von der publizierten AP3 Sequenz (AL132971, Nukleotidregion 9298–10200) unterscheidet (Position 33: T statt G, Position 55: T statt G). Diese Nukleotidunterschiede wurden in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentieren somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Arabidopsis thaliana* Pflanze.

[0138] Die modifizierte Version AP3P wurde mittels rekombinanter PCR unter Verwendung des Plasmids pTAP3 hergestellt. Die Region 10200–9771 wurde mit den Primern PR7 (SEQ ID No. 15) und Primern PR9 (SEQ ID No. 17) amplifiziert (Amplifikat A7/9), die Region 9526–9285 wurde mit den PR8 (SEQ ID No. 16) und PR10 (SEQ ID No. 18) amplifiziert (Amplifikat A8/10).

[0139] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR-Reaktionen zur Amplifikation der DNA-Fragmente, die für die Regionen Region 10200–9771 und 9526–9285 des AP3 Promoters kodieren, erfolgte in 50 µl Reaktionsansätzen, in denen enthalten war:

- 100 ng AP3 Amplifikat (oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR7 (SEQ ID No. 15) bzw. PR8 (SEQ ID No. 16)
- 0,2 mM PR9 (SEQ ID No. 17) bzw. PR10 (SEQ ID No. 18)
- 5 µl 10 × PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28,8 µl Aq. Dest.

[0140] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1 X	94°C	2 Minuten
35 X	94°C	1 Minute
	50°C	2 Minuten
	72°C	3 Minuten
1 X	72°C	10 Minuten

[0141] Die rekombinante PCR beinhaltet Annealing der sich über eine Sequenz von 25 Nukleotiden überlappenden Amplifikate A7/9 und A8/10, Vervollständigung zu einem Doppelstrang und anschließende Amplifizierung. Dadurch entsteht eine modifizierte Version des AP3 Promoters, AP3P, in dem die Positionen 9670–9526 deletiert sind. Die Denaturierung (5 min bei 95°C) und Annealing (langsame Abkühlung bei Raumtemperatur auf 40°C) beider Amplifikate A7/9 und A8/10 erfolgte in einem 17,6 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 0,5 µg A7/9



– 0,25 µg A8/10

[0142] Das Auffüllen der 3'Enden (30 min bei 30°C) erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 17,6 µl A7/9 und A8/10-Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 50 µM dNTPs
- 2 µl 1 × Klenow Puffer
- 2 U Klenow Enzym

[0143] Die Nukleinsäure kodierend für die modifizierte Promoterversion AP3P wurde mittels PCR unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR7 SEQ ID No. 15) und eines antisense spezifischen Primers (PR10 SEQ ID No. 18) amplifiziert.

[0144] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des AP3P Fragmentes erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl Annealingsreaktion (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 mM PR7 (SEQ ID No. 15)
- 0,2 mM PR10 (SEQ ID No. 18)
- 5 µl 10 × PCR-Puffer (Stratagene)
- 0,25 µl Pfu Taq Polymerase (Stratagene)
- 28,8 µl Aq. Dest.

[0145] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1 X	94°C	2 Minuten
35 X	94°C	1 Minute
	50°C	1 Minuten
	72°C	1 Minuten
1 X	72°C	10 Minuten

[0146] Die PCR-Amplifikation mit PR7, SEQ ID No. 15 und PR10 SEQ ID No. 18 resultierte in einem 778 Bp Fragment das für die modifizierte Promoterversion AP3P kodiert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern T7 und M13 bestätigten eine zur Sequenz AL132971, Region 10200-9298 identische Sequenz, wobei die interne Region 9285-9526 deletiert wurde. Diese Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJIT117 (Guerineau et al. 1988, Nucl. Acids Res. 16: 11380) verwendet.

[0147] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 Bp SacI-HindIII Fragmentes aus pTAP3P und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJIT117. Der Klon, der den Promoter AP3P anstelle des ursprünglichen Promoters d35S enthält, heißt pJAP3P.

[0148] Ein DNA-Fragment, das das PIV2 Intron des Gens ST-LS1 enthält wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNR p35SGUS INT (Vancanneyt G. et al.(1990) Mol Gen Genet 220: 245–50) sowie der Primer PR40 (Seq ID No. 20) und Primer PR41 (Seq ID No. 21) hergestellt.

[0149] Die PCR-Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation der Sequenz des Intron PIV2 des Gens ST-LS1, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl p35SGUS INT
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM PR40 (SEQ ID No. 20)
- 0,2 µM PR41 (SEQ ID No. 21)
- 5 µl 10 × PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl Aq. Dest.

[0150] Die PCR wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	53°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

[0151] Die PCR-Amplifikation mit PR40 und PR41 resultierte in einem 206 Bp-Fragment. Unter Verwendung von Standardmethoden wurde das Amplifikat in den PCR-Klonierungsvektor pBluntII (Invitrogen) kloniert und der Klon pBluntII-40-41 erhalten. Sequenzierungen dieses Klon mit dem Primer SP6 bestätigte eine Sequenz, die identisch ist mit der entsprechenden Sequenz aus dem Vektor p35SGUS INT.

[0152] Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Vektor pJAP3P (oben beschrieben).

[0153] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 206 Bp Sall-BamHI Fragmentes aus pBluntII-40-41 und Ligierung mit dem Sall-BamHI geschnittenen Vektor pJAP3P. Der Klon, der das Intron PIV2 des Gens ST-LS1 in der korrekten Orientierung anschließend an das 3'Ende des rbcS Transitpeptides enthält, heißt pJA11 und ist geeignet, Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Inverted-Repeat Transkripten herzustellen.

[0154] In der **Abb. 2** beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment rbcS das rbcS Transitpeptid aus Erbse (204 bp), Fragment intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Beispiel 2: Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Epsiloncyclase dsRNAs in *Tagetes erecta* (gerichtet gegen die 5'Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

[0155] Die Nukleinsäure, die die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession no. AF251016) enthält, wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tagetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR42 SEQ ID No. 22) und eines antisense spezifischen Primers (PR43 SEQ ID No. 23) amplifiziert. Die 5'terminale 435 bp Region der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tagetes erecta* setzt sich zusammen aus 138 bp 5'Nicht-translatierter Sequenz (5'UTR) und 297 bp der dem N-Terminus entsprechenden kodierenden Region.

[0156] Für die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes* wurden 100mg der gefrorenen, pulverisierten Blüten in ein Reaktionsgefäß überführt und in 0,8 ml Trizol-Puffer (LifeTechnologies) aufgenommen. Die Suspension wurde mit 0,2 ml Chloroform extrahiert. Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 12000 g wurde der wässrige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Ethanol extrahiert. Die RNA wurde mit einem Volumen Isopropanol gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und das Pellet in DEPC Wasser (über Nacht Inkubation von Wasser mit 1/1000 Volumen Diethylpyrocarbonat bei Raumtemperatur, anschließend autoklaviert) gelöst. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Für die cDNA-Synthese wurden 2,5  $\mu$ g Gesamt-RNA für 10 min bei 60°C denaturiert, für 2 min auf Eis abgekühlt und mittels eines cDNA-Kits (Ready-to-go-you-prime-beads, Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben unter Verwendung eines antisense spezifischen Primers (PR17 SEQ ID No. 19) in cDNA umgeschrieben.

[0157] Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR42-PR43 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50  $\mu$ l Reaktionsansatz, in dem enthalten war

- 1  $\mu$ l cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2  $\mu$ M PR42 (SEQ ID No. 22)
- 0,2  $\mu$ M PR43 (SEQ ID No. 23)
- 5  $\mu$ l 10  $\times$  PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25  $\mu$ l R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8  $\mu$ l Aq. Dest.

[0158] Die PCR zur Amplifikation des PR44-PR45 DNA-Fragmentes, das die 5'terminale 435 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50  $\mu$ l Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1  $\mu$ l cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2  $\mu$ M PR44 (SEQ ID No. 24)
- 0,2  $\mu$ M PR45 (SEQ ID No. 25)
- 5  $\mu$ l 10  $\times$  PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25  $\mu$ l R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8  $\mu$ l Aq. Dest.

[0159] Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	58°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

[0160] Die PCR-Amplifikation mit Primer PR42 und PR43 resultierte in einem 443 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR44 und PR45 resultierte in einem 444 Bp-Fragment.

[0161] Die beiden Amplifikate, das PR42-PR43 (HindIII-Sall sense) Fragment und das PR44-PR45 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID No. 4) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klone wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 1) verwendet.

[0162] Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 444 Bp PR44-PR45 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heißt pJAI2. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem antisense Fragment der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

[0163] Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 443 Bp PR42-PR43 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-Sall geschnittenen Vektor pJAI2. Der Klon, der 435 by 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heißt pJAI3. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem sense Fragment der 5'terminale Region der Epsilon-Cyclase.

[0164] Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC5 (SEQ ID No. 42) und PRCHRC3 (SEQ ID No. 43) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor pJAI3 verwendet.

[0165] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor pJAI3. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält, heißt pJCI3.

[0166] Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation der AP3P- bzw. CHRC-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO02/00900).

[0167] Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI3 wurde das 2622 bp SacI-XhoI Fragment aus pJAI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (**Abb. 3**, Konstruktkarte).

[0168] In der **Abb. 3** beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment 5sense die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 5anti die 5'Region der Epsilon-cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in antisense Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

[0169] Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI3 wurde das 3394 bp SacI-XhoI Fragment aus pJCI3 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (**Abb. 4**, Konstruktkarte).

[0170] In der **Abb. 4** beinhaltet Fragment CHRC den Promoter (1537 bp), Fragment 5sense die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in Sense-Orientierung, Fragment Intron das Intron PIV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment 5anti die 5'Region der Epsilon-Cyclase aus *Tapetes erecta* (435 bp) in Antisense-Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

Beispiel 3: Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenesspezifische Expression von Epsiloncyclase dsRNAs in *Tapetes erecta* (gerichtet gegen die 3'Region der Epsilon-Cyclase cDNA)

[0171] Die Nukleinsäure, die die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank accession no. AF251016) enthält wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Tapetes erecta* cDNA unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (PR46 SEQ ID No. 26) und eines antisense spezifischen Primers (PR47 SEQ ID No. 27) amplifiziert. Die 3'terminale Region (384 bp) der Epsilon-Cyclase cDNA aus *Tapetes erecta* setzt sich zusammen aus 140 bp 3'-Nicht-translatierter Sequenz (3'UTR) und 244 bp der dem C-Termini-

nus entsprechenden kodierenden Region.

[0172] Die Präparation von Total-RNA aus Blüten von *Tagetes erecta* erfolgte wie unter Beispiel 2 beschrieben.

[0173] Die cDNA Synthese erfolgte wie unter Beispiel 1 unter Verwendung des antisense spezifischen Primers PR17 (SEQ ID No. 19) beschrieben.

[0174] Die Bedingungen der anschließenden PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR46-PR457 DNA-Fragmentes, das die 3'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM PR46 (SEQ ID No. 26)
- 0,2 µM PR47 (SEQ ID No. 27)
- 5 µl 10 × PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl Aq. Dest.

[0175] Die PCR zur Amplifikation des PR48-PR49 DNA-Fragmentes, das die 3'terminale 384 bp Region der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM PR48 (SEQ ID No. 28)
- 0,2 µM PR49 (SEQ ID No. 29)
- 5 µl 10 × PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl Aq. Dest.

[0176] Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	58°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

[0177] Die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No.26 und SEQ ID No. 27 resultierte in einem 392 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit SEQ ID No. 28 und SEQ ID No. 29 resultierte in einem 396 Bp-Fragment.

[0178] Die beiden Amplifikate, das PR46-PR47 Fragment und das PR48-PR49 Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-B1untII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine zur publizierten Sequenz AF251016 (SEQ ID No. 4) identische Sequenz abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen. Diese Klone wurde daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 1) verwendet.

[0179] Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 396 Bp PR48-PR49 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, der 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase in der antisense Orientierung enthält, heißt pJAI4. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Antisense-Fragment der 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase und dem Polyadenylierungssignal aus CaMV.

[0180] Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 392 Bp PR46-PR47 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem HindIII-Sall geschnittenen Vektor pJAI4. Der Klon, der 392 by 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase cDNA in der sense Orientierung enthält, heißt pJAI5. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem AP3P und dem Sense-Fragmente 3'terminale Region der Epsilon-Cyclase.

[0181] Die Herstellung eines Expressionsvektors für die Agrobacteriumvermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUNS (WO 02/00900). Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5AI5 wurde das 2523 bp SacI-XhoI Fragment aus pJAI5 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (Abb. 5, Konstruktkarte).

[0182] In der Abb. 5 beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment sense die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in sense Orientierung, Fragment intron das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1, Fragment anti die 3'region der Epsilon cyclase aus *Tagetes erecta* (435 bp) in antisense Orientierung, und Fragment term (761 Bp) das Polyadenylierungssignal von CaMV.

## Beispiel 4: Klonierung des Epsilon-Cyclase Promoters

[0183] Ein 199 bp Fragment bzw. das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters wurde durch zwei unabhängige Klonierungsstrategien, Inverse PCR (adaptiert Long et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 90: 10370) und TAIL-PCR (Liu Y-G. et al. (1995) Plant J. 8: 457–463) unter Verwendung genomischer DNA (nach Standardmethode aus *Tagetes erecta*, Linie Orangenprinz, isoliert) isoliert.

[0184] Für den Inverse PCR-Ansatz wurden 2 µg genomische DNA in einem 25 µl Reaktionsansatz mit EcoRV und RsaI verdaut, anschließend auf 300 µl verdünnt und über Nacht bei 16°C mit 3U Ligase religiert. Unter Verwendung der Primer PR50 (SEQ ID No. 30) und PR51 (SEQ ID No. 31) wurde durch PCR Amplifikation ein Fragment hergestellt, das, jeweils in Sense-Orientierung, 354 bp der Epsilon-Cyclase cDNA (Genbank Accession AF251016), ligiert an 300 bp des Epsilon-Cyclase Promoters sowie 70 bp des 5'terminalen Bereichs der cDNA Epsilon-Cyclase enthält (siehe Abb. 6).

[0185] Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR50-PR51 DNA-Fragmentes, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl Ligationsansatz (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM PR50 (SEQ ID No. 30)
- 0,2 µM PR51 (SEQ ID No. 31)
- 5 µl 10 × PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl Aq. Dest.

[0186] Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	53°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

[0187] Die PCR-Amplifikation mit Primer PR50 und PR51 resultierte in einem 734 Bp-Fragment, das unter anderem das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (Abb. 6).

[0188] Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID No. 11. Diese Sequenz wurde in einem unabhängigen Amplifikationsexperiment reproduziert und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten *Tagetes erecta* Linie Orangenprinz.

[0189] Für den TAIL-PCR Ansatz wurden drei sukzessive PCR-Reaktionen mit jeweils unterschiedlichen gen-spezifischen Primern (nested primers) durchgeführt.

[0190] Die TAIL1-PCR erfolgte in einem 20 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 ng genomische DNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,2 mM jedes dNTPs
- 0,2 µM PR60 (SEQ ID No. 32)
- 0,2 µM AD1 (SEQ ID No. 35)
- 2 µl 10 × PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,5 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- mit Aq. Dest. auf 20 µl aufgefüllt

[0191] AD1 stellte dabei zunächst eine Mischung aus Primern der Sequenzen (a/c/g/t)tc-ga(g/c)t(a/t)t(g/c)g(a/t)gtt dar.

[0192] Die PCR-Reaktion TAIL1 wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X 93°C: 1 Min., 95°C: 1 Min.  
 5X 94°C: 30 Sek., 62°C: 1 Min., 72°C: 2,5 Min.  
 1X 94°C: 30 Sek., 25°C: 3 Min., ramp to 72°C in 3 Min.  
 72°C: 2,5 Min  
 15X 94°C: 10 Sek., 68°C: 1 Min., 72°C: 2,5 Min.;  
 94°C: 10 Sek., 68°C: 1 Min., 72°C: 2,5 Min.;  
 94°C: 10 Sek., 29°C: 1 Min., 72°C: 2,5 Min.  
 1X 72°C: 5 Min.

[0193] Die TAIL2-PCR erfolgte in einem 21 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:  
 - 1 µl einer 1:50 Verdünnung des TAIL1-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben beschrieben)  
 - 0,8 mM dNTP  
 - 0,2 µM PR61 (SEQ ID No. 33)  
 - 0,2 µM AD1 (SEQ ID No. 35)  
 - 2 µl 10 × PCR-Puffer (TAKARA)  
 - 0,5 µl R Taq Polymerase (TAKARA)  
 - mit Aq. Dest. auf 21 ul aufgefüllt

[0194] Die PCR-Reaktion TAIL2 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

12X 94°C: 10 Sekunden, 64°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten;  
 94°C: 10 Sekunden, 64°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten;  
 94°C: 10 Sekunden, 29°C: 1 Minute, 72°C: 2.5 Minuten  
 1X 72°C: 5 Minuten

[0195] Die TAIL3-PCR erfolgte in einem 100 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:  
 - 1 µl einer 1:10 Verdünnung des TAIL2-Reaktionsansatzes (hergestellt wie oben beschrieben)  
 - 0,8 mM dNTP  
 - 0,2 µM PR63 (SEQ ID No. 34)  
 - 0,2 µM AD1 (SEQ ID No. 35)  
 - 10 µl 10 × PCR-Puffer (TAKARA)  
 - 0,5 µl R Taq Polymerase (TAKARA)  
 - mit Aq. Dest. auf 100 u1 aufgefüllt

[0196] Die PCR-Reaktion TAIL3 wurde unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

20X 94°C: 15 Sekunden, 29°C: 30 Sekunden, 72°C: 2 Minuten  
 1X 72°C: 5 Minuten

[0197] Die PCR-Amplifikation mit Primer PR63 und AD1 resultierte in einem 280 Bp-Fragment, das unter anderem das 199 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält (**Abb. 7**).

[0198] Das Amplifikat, wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit den Primern M13 und T7 ergaben die Sequenz SEQ ID No. 12. Diese Sequenz ist identisch mit der ecyclase Region innerhalb der Sequenz SEQ ID No. 11, die mit der IPCR Strategie isoliert wurde, und repräsentiert somit die Nukleotidsequenz in der verwendeten Tagetes erecta Linie Orangenprinz.

[0199] Der pCR2.1-Klon, der das 312 bp Fragment (SEQ ID No. 11) des Epsilon-Cyclase Promoters, das durch die IPCR-Strategie isoliert wurde, enthält, heißt pTA-ecycP und wurde für die Herstellung der IR Konstrukte verwendet.

Beispiel 5: Herstellung einer Inverted-Repeat-Expressionskassette für die blütenspezifische Expression von Epsilon-cyclase dsRNAs in Tagetes erecta (gerichtet gegen die Promoterregion der Epsilon-Cyclase cDNA).

[0200] Die Expression von Inverted-Repeat Transkripten bestehend aus Promoterfragmenten der Epsilon-Cyclase in Tagetes erecta erfolgte unter Kontrolle einer modifizierten Version AP3P des blütenspezifischen Promoters AP3 aus Arabidopsis (siehe Beispiel 1) oder des blütenspezifischen Promoters CHRC (Genbank accession no. AF099501). Das Inverted-Repeat Transkript enthält jeweils ein Epsilon-Cyclase-Promoterfrag-

ment in korrekter Orientierung (Sense-Fragment) und ein sequenzidentisches Epsilon-Cyclase-Promoterfragment in entgegengesetzter Orientierung (Antisense-Fragment), die durch ein funktionelles Intron (siehe Beispiel 1) miteinander verbunden sind.

[0201] Die Promoterfragmente wurde mittels PCR unter Verwendung von Plasmid-DNA (Klon pTA-ecycP, siehe Beispiel 4) und der Primer PR124 (SEQ ID No. 36) und PR126 (SEQ ID No. 38) bzw. der Primer PR125 (SEQ ID No. 37) und PR127 (SEQ ID No. 39) hergestellt.

[0202] Die Bedingungen der PCR-Reaktionen waren die folgenden:

Die PCR zur Amplifikation des PR124-PR126 DNA-Fragmentes, das das Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM PR124 (SEQ ID No. 36)
- 0,2 µM PR126 (SEQ ID No. 38)
- 5 µl 10 × PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl Aq. Dest.

[0203] Die PCR zur Amplifikation des PR125-PR127 DNA-Fragmentes, das das 312bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase enthält, erfolgte in einem 50 µl Reaktionsansatz, in dem enthalten war:

- 1 µl cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)
- 0,25 mM dNTPs
- 0,2 µM PR125 (SEQ ID No. 37)
- 0,2 µM PR127 (SEQ ID No. 39)
- 5 µl 10 × PCR-Puffer (TAKARA)
- 0,25 µl R Taq Polymerase (TAKARA)
- 28,8 µl Aq. Dest.

[0204] Die PCR-Reaktionen wurden unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

1X	94°C	2 Minuten
35X	94°C	1 Minute
	53°C	1 Minute
	72°C	1 Minute
1X	72°C	10 Minuten

[0205] Die PCR-Amplifikation mit Primer PR124 und PR126 resultierte in einem 358 Bp-Fragment, die PCR-Amplifikation mit Primer PR125 und PR127 resultierte in einem 361 Bp-Fragment.

[0206] Die beiden Amplifikate, das PR124-PR126 (HindIII-Sall sense) Fragment und das PR125-PR127 (EcoRI-BamHI antisense) Fragment, wurden unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR-Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen mit dem Primer SP6 bestätigten jeweils eine Sequenz, die abgesehen von den eingeführten Restriktionsstellen identisch ist zu SEQ ID No. 11. Diese Klone wurden daher für die Herstellung eines Inverted-Repeat Konstrukts in dem Klonierungsvektor pJAI1 (siehe Beispiel 1) verwendet.

[0207] Der erste Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 358 Bp PR124-PR126 HindIII-Sall Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit dem BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor pJAI1. Der Klon, das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der sense Orientierung enthält, heißt cs43. Durch die Ligation wird das Sense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters zwischen den AP3P Promoter und das Intron eingefügt.

[0208] Der zweite Klonierungsschritt erfolgte durch Isolierung des 361bp PR125-PR127 BamHI-EcoRI Fragmentes aus dem Klonierungsvektor pCR-BluntII (Invitrogen) und Ligierung mit BamHI-EcoRI geschnittenen Vektor cs43. Der Klon, der das Epsilon-Cyclase Promoterfragment in der antisense Orientierung enthält, heißt cs44. Durch die Ligation entsteht eine transkriptionelle Fusion zwischen dem Intron und dem Antisense-Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters.

[0209] Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle des CHRC-Promoters wurde ein CHRC-Promoterfragment unter Verwendung genomischer DNA aus Petunie (nach Standardmethoden hergestellt) sowie der Primer PRCHRC3' (SEQ ID NO. 43) und PRCHRC5' (SEQ ID NO. 42) amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Sequenzierungen des resultierenden Klons pCR2.1-CHRC mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz AF099501 identische Sequenz. Dieser Klon wurde daher für die Klonierung in den Expressionsvektor cs44 verwendet.

[0210] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 1537 bp SacI-HindIII Fragments aus pCR2.1-CHRC und Ligierung in den SacI-HindIII geschnittenen Vektor cs44. Der Klon, der den Promoter CHRC anstelle des ursprünglichen Promoters AP3P enthält, heißt cs45.

[0211] Für die Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren, des CHRC-Promoter und des AP3P-Promoters, wurde der AP3P-Promoter in antisense Orientierung an den 3'Terminus des Epsilon-Cyclase antisense Fragmentes in cs45 kloniert. Das AP3P-Promoterfragments aus pJA11 wurde unter Verwendung der Primer PR128 und PR129 amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den Klonierungsvektor pCR2.1 (Invitrogen) kloniert. Die Sequenzierung mit den Primern M13 und T7 bestätigten eine zur Sequenz SEQ ID No. 1 identische Sequenz. Dieser Klon pCR2.1-AP3PSX wurde für Herstellung einer Inverted-Repeat Expressionskassette unter Kontrolle zweier Promotoren verwendet.

[0212] Die Klonierung erfolgte durch Isolierung des 771 bp SalI-XhoI Fragments aus pCR2.1-AP3PSX und Ligierung in den XhoI geschnittenen Vektor cs45. Der Klon, der 3'seitig des Inverted Repeats, den Promoter AP3P in antisense Orientierung enthält, heißt cs46.

[0213] Die Herstellung der Expressionsvektoren für die Agrobacterium-vermittelte Transformation des AP3P-kontrollierten Inverted-Repeat Transkripts in *Tagetes erecta* erfolgte unter der Verwendung des binären Vektors pSUN5 (WO 02/00900).

[0214] Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5RI7 wurde das 1685bp SacI-XhoI Fragment aus cs44 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (**Abb. 8**, Konstruktkarte).

[0215] In der **Abb. 8** beinhaltet Fragment AP3P den modifizierten AP3P Promoter (771 bp), Fragment P-sense das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment intron das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment P-anti das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung.

[0216] Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI7 wurde das 2445bp SacI-XhoI Fragment aus cs45 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (**Abb. 9**, Konstruktkarte).

[0217] In der **Abb. 9** beinhaltet Fragment CHRC den CHRC-Promoter (1537 bp), Fragment P-sense das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment intron das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), und Fragment P-anti das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung.

[0218] Zur Herstellung des Expressionsvektors pS5CI7 wurde das 3219bp SacI-XhoI Fragment aus cs46 mit dem SacI-XhoI geschnittenen Vektor pSUN5 ligiert (**Abb. 10**, Konstruktkarte)

[0219] In der **Abb. 10** beinhaltet Fragment CHRC den CHRC-Promoter (1537 bp), Fragment P-sense das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in sense Orientierung, Fragment intron das Intron IV2 des Kartoffel-Gens ST-LS1), Fragment P-anti das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase in antisense Orientierung und das Fragment AP3P das 771 bp AP3P-Promoterfragment in antisense Orientierung.

#### Beispiel 6: Herstellung transgener *Tagetes* Pflanzen

[0220] *Tagetes*essamen werden sterilisiert und auf Keimungsmedium (MS-Medium; Murashige and Skoog, *Physiol. Plant.* 15(1962), 473–497) pH 5,8, 2% Saccharose) aufgelegt. Die Keimung erfolgt in einem Temperatur/Licht/Zeitintervall von 18 bis 28°C/20 bis 200  $\mu$ E/3 bis 16 Wochen, bevorzugt jedoch bei 21°C, 20 bis 70  $\mu$ E, für 4 bis 8 Wochen.

[0221] Alle Blätter der sich bis dahin entwickelten *in vitro* Pflanzen werden geerntet und quer zur Mittelrippe geschnitten. Die dadurch entstehenden Blattexplantate mit einer Größe von 10 bis 60 mm<sup>2</sup> werden im Verlaufe der Präparation in flüssigem MS-Medium bei Raumtemperatur für maximal 2 h aufbewahrt.

[0222] Der *Agrobacterium tumefaciens* Stamm EHA105 wurde mit dem Binärplasmid PSSAI3 transformiert. Die Anzucht des transformierten *A. tumefaciens* Stammes EHA105 erfolgte über Nacht unter folgenden Bedingungen: Eine Einzelkolonie wurde in YEB (0,1% Hefeextrakt, 0,5% Rindfleischextrakt, 0,5% Pepton, 0,5% Saccharose, 0,5% Magnesiumsulfat  $\times$  7 H<sub>2</sub>O) mit 25 mg/l Kanamycin angeimpft und bei 28°C für 16 bis 20 h angezogen. Anschließend wurde die Bakteriensuspension durch Zentrifugation bei 6000 g für 10 min geerntet und derart in flüssigem MS Medium resuspendiert, dass eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1 bis 0,8 entstand. Diese Suspension wurde für die Co-Kultivierung mit dem Blattmaterial verwendet.

[0223] Unmittelbar vor der Co-Kultivierung wird das MS-Medium, in dem die Blätter aufbewahrt worden sind, durch die Bakteriensuspension ersetzt. Die Inkubation der Blättchen in der *Agrobacteriensuspension* erfolgte für 30 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur. Anschließend werden die infizierten Explantate auf ein mit Agar (z.B. 0,8% Plant Agar (Duchefa, NL) verfestigtes MS-Medium mit Wachstumsregulatoren, wie beispielsweise 3 mg/l Benzylaminopurin (BAP) sowie 1 mg/l Indolylessigsäure (IAA) aufgelegt. Die Orientierung der Blätter auf dem Medium ist bedeutungslos. Die Kultivierung der Explantate findet für 1 bis 8 Tage, bevorzugt aber für 6 Tage statt, dabei können folgende Bedingungen angewendet werden: Lichtintensität: 30 bis 80  $\mu$ Mol/m<sup>2</sup>  $\times$  sec, Temperatur: 22 bis 24°C, hell/dunkel Wechsel von 16/8 Stunden. Anschließend werden die co-kultivierten Explantate auf frisches MS-Medium, bevorzugt mit den gleichen Wachstumsregulatoren über-



tragen, wobei dieses zweite Medium zusätzlich ein Antibiotikum zur Unterdrückung des Bakterienwachstums enthält. Timentin in einer Konzentration von 200 bis 500 mg/l ist für diesen Zweck sehr geeignet. Als zweite selektive Komponente wird eine für die Selektion des Transformationserfolges eingesetzt. Phosphinothricin in einer Konzentration von 1 bis 5 mg/l selektiert sehr effizient, aber auch andere selektive Komponenten gemäß des zu verwendenden Verfahrens sind denkbar.

[0224] Nach jeweils ein bis drei Wochen erfolgt der Transfer der Explantate auf frisches Medium bis sich Sprossknospen und kleine Sprosse entwickeln, die dann auf das gleiche Basalmedium einschließlich Timentin und PPT oder alternative Komponenten mit Wachstumsregulatoren, nämlich z.B. 0,5 mg/l Indolylbuttersäure (IBA) und 0,5 mg/l Gibberillinsäure  $GA_3$ , zur Bewurzelung übertragen werden. Bewurzelte Sprosse können ins Gewächshaus überführt werden.

[0225] Zusätzlich zu der beschriebenen Methode sind folgende vorteilhafte Modifikationen möglich:

- Bevor die Explantate mit den Bakterien infiziert werden, können sie für 1 bis 12 Tage, bevorzugt 3 bis 4, auf das oben beschriebene Medium für die Co-Kultur vorinkubiert werden. Anschließend erfolgt die Infektion, Co-Kultur und selektive Regeneration wie oben beschrieben.
- Der pH Wert für die Regeneration (normalerweise 5,8) kann auf pH 5,2 gesenkt werden. Dadurch wird die Kontrolle des Agrobakterienwachstums verbessert.
- Die Zugabe von  $AgNO_3$  (3 bis 10 mg/l) zum Regenerationsmedium verbessert den Zustand der Kultur einschließlich der Regeneration selbst.
- Komponenten, die die Phenolbildung reduzieren und dem Fachmann bekannt sind, wie z.B. Zitronensäure, Ascorbinsäure, PVP u.v.a.m., wirken sich positiv auf die Kultur aus.
- Für das gesamte Verfahren kann auch flüssiges Kulturmedium Verwendung finden. Die Kultur kann auch auf handelsüblichen Trägern, die auf dem flüssigen Medium positioniert werden inkubiert werden.

[0226] Gemäß der oben beschriebenen Transformationsmethode wurden mit folgenden Expressionskonstrukten folgende Linien erhalten:

Mit pS5Al3 wurde erhalten: CS30-1, CS30-3 und CS30-4

#### Beispiel 7: Charakterisierung der transgenen Pflanzen

[0227] Das Blütenmaterial der transgenen *Tagetes erecta* Pflanzen aus Beispiel 6 wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und das Pulver (etwa 250 bis 500 mg) mit 100% Aceton extrahiert (dreimal je 500 µl). Das Lösungsmittel wurde evaporiert und die Carotinoide in 100 µl Aceton resuspendiert.

[0228] Mittels einer C30-reverse phase-Säule konnte zwischen Mono- und Diestern der Carotinoide unterschieden werden. HPLC-Laufbedingungen waren nahezu identisch mit einer publizierten Methode (Frazer et al. (2000), Plant Journal 24(4): 551–558). Eine Identifizierung der Carotinoide war aufgrund der UV-VIS-Spektren möglich.

[0229] Tabelle 1 zeigt das Carotinoidprofil in *Tagetes* petalen der gemäß der vorstehend beschriebenen Beispiele hergestellten transgenen *Tagetes*- und Kontrolltagetespflanzen. Alle Carotinoidmengen sind in [µg/g] Frischgewicht angegeben, prozentuale Veränderungen gegenüber der Kontrollpflanze sind in Klammern angegeben.

[0230] Im Vergleich zur genetisch nicht veränderten Kontrollpflanze, weisen die genetisch veränderten Pflanzen einen deutlich erhöhten Gehalt an Carotinoiden des "β-Carotin-Weges", wie beispielsweise β-Carotin und Zeaxanthin und einen deutlich reduzierten Gehalt an Carotinoiden des "α-Carotin-Weges", wie beispielsweise Lutein auf.

Tabelle 1

Pflanze	Lutein	β-Carotin	Zeaxanthin	Violaxanthin	Gesamt-Carotinoide
Kontrolle	260	4,8	2,7	36	304
CS 30-1	35 (–86%)	13 (+170%)	4,4 (+62%)	59 (+63%)	111 (–63%)
Kontrolle	456	6,4	6,9	58	527
CS 30-3	62 (–86%)	13 (+103%)	8,9 (+29%)	75 (+29%)	159 (–70%)
CS 30-4	68 (–85%)	9,1 (+42%)	5,7 (–17%)	61 (+5%)	144 (–73%)
Kontrolle	280	4,1	2,6	42	329
CS 32-9	69 (–75%)	5,5 (+34%)	2,3 (–12%)	25 (–38%)	102 (–69%)

Vergleichsbeispiel 1: Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität in *Tagetes erecta* durch Antisense

[0231] Unter Verwendung herkömmlicher, dem Fachmann bekannter Methoden wurde als Vergleichsbeispiel eine *Tagetes erecta* Antisense-Linie CS32-9 hergestellt bei der die Reduzierung der  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität durch Antisense erfolgte. Das Carotinoidprofil dieser Linie (CS32-9), gemessen nach vorstehend beschriebener Methode ist ebenfalls in Tabelle 1 dargestellt.

## SEQUENCE LISTING

<110> SunGene GmbH & Co KGaA

<120> Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischenn- und/oder Folgeprodukten

<130> NAE 439/02

<160> 43

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 777

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<220>

<221> promoter

<222> (1) .. (777)

<223>

<400> 1

```

gagctcactc actgatttcc attgcttgaa aattgatgat gaactaagat caatccatgt      60
tagtttcaaa acaacagtaa ctgtggccaa cttagttttg aaacaacact aactgggtcga    120
agcaaaaaga aaaaagagtt tcatcatata tctgatttga tggactgttt ggagtttagga    180
ccaaacatta tctacaaaca aagacttttc tcctaacttg tgattccttc ttaaacccta    240
ggggtaatat tctattttcc aaggatcttt agttaaaggc aaatccggga aattattgta    300
atcatttggg gaaacatata aaagatttga gttagatgga agtgacgatt aatccaaaca    360
tatatatctc tttcttctta tttcccaaat taacagacaa aagtagaata ttggctttta    420
acaccaatat aaaaacttgc ttcacaccta aacacttttg tttacttttag ggtaagtgca    480
aaaagccaac caaatccacc tgcactgatt tgacgtttac aaacgccggt aagtcgatgt    540
ccgttgattt aaacagtgtc ttgtaattaa aaaaatcagt ttacataaat ggaaaattta    600
tcacttagtt ttcatcaact tctgaactta cttttcatgg attaggcaat actttccatt    660
tttagtaact caagtggacc ctttacttct tcaactccat ctctctcttt ctatttcact    720
tctttcttct cattatatct cttgtcctct ccaccaaate tcttcaacaa aaagett      777

```

<210> 2

<211> 195

<212> DNA

<213> Kartoffel

<220>  
 <221> Intron  
 <222> (1)..(195)  
 <223>

<400> 2  
 tacgtaagtt tctgcttcta cctttgatat atatataata attatcatta attagtagta 60  
 atataatatt tcaaataattt ttttcaaaat aaaagaatgt agtatatagc aattgctttt 120  
 ctgtagttta taagtgtgta tattttaatt tataactttt ctaatatatg accaaaattt 180  
 gttgatgtgc agctg 195

<210> 3  
 <211> 212  
 <212> DNA  
 <213> kuenstliche Sequenz

<220>  
 <221> Intron  
 <222> (1)..(212)  
 <223>

<400> 3  
 gtcgactacg taagtttctg cttctacctt tgatatatat ataataatta tcattaatta 60  
 gtagtaatat aatatttcaa atattttttt caaaataaaa gaatgtagta tatagcaatt 120  
 gcttttctgt agtttataag tgtgtatatt ttaatttata acttttctaa tatatgacca 180  
 aaatttggtg atgtgcaggc atcaccggat cc 212

<210> 4  
 <211> 1830  
 <212> DNA  
 <213> Tagetes erecta

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (141)..(1691)  
 <223>

<400> 4  
 ggacagaggc aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttggtga gagacactcc aatccaaaca 60  
 gatacaaggc gtgactggat atttctctct cgttcctaac aacagcaacg aagaagaaaa 120  
 agaatcatta ctaacaatca atg agt atg aga gct gga cac atg acg gca aca 173  
 Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr  
 1 5 10

atg gcg gct ttt aca tgc cct agg ttt atg act agc atc aga tac acg Met Ala Ala Phe Thr Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr 15 20 25	221
aag caa att aag tgc aac gct gct aaa agc cag cta gtc gtt aaa caa Lys Gln Ile Lys Cys Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln 30 35 40	269
gag att gag gag gaa gaa gat tat gtg aaa gcc ggt gga tcg gag ctg Glu Ile Glu Glu Glu Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu 45 50 55	317
ctt ttt gtt caa atg caa cag aat aag tcc atg gat gca cag tct agc Leu Phe Val Gln Met Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser 60 65 70 75	365
cta tcc caa aag ctc cca agg gta cca ata gga gga gga gga gac agt Leu Ser Gln Lys Leu Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser 80 85 90	413
aac tgt ata ctg gat ttg gtt gta att ggt tgt ggt cct gct ggc ctt Asn Cys Ile Leu Asp Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu 95 100 105	461
gct ctt gct gga gaa tca gcc aag cta ggc ttg aat gtc gca ctt atc Ala Leu Ala Gly Glu Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile 110 115 120	509
ggc cct gat ctt cct ttt aca aat aac tat ggt gtt tgg gag gat gaa Gly Pro Asp Leu Pro Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu 125 130 135	557
ttt ata ggt ctt gga ctt gag ggc tgt att gaa cat gtt tgg cga gat Phe Ile Gly Leu Gly Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp 140 145 150 155	605
act gta gta tat ctt gat gac aac gat ccc att ctc ata ggt cgt gcc Thr Val Val Tyr Leu Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala 160 165 170	653
tat gga cga gtt agt cgt gat tta ctt cac gag gag ttg ttg act agg Tyr Gly Arg Val Ser Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg 175 180 185	701
tgc atg gag tca ggc gtt tca tat ctg agc tcc aaa gtg gaa cgg att Cys Met Glu Ser Gly Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile 190 195 200	749
act gaa gct cca aat ggc cta agt ctc ata gag tgt gaa ggc aat atc Thr Glu Ala Pro Asn Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile 205 210 215	797
aca att cca tgc agg ctt gct act gtc gct tct gga gca gct tct gga Thr Ile Pro Cys Arg Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly 220 225 230 235	845
aaa ctt ttg cag tat gaa ctt ggc ggt ccc cgt gtt tgc gtt caa aca	893

Lys	Leu	Leu	Gln	Tyr	Glu	Leu	Gly	Gly	Pro	Arg	Val	Cys	Val	Gln	Thr		
				240					245					250			
gct	tat	ggt	ata	gag	gtt	gag	gtt	gaa	agc	ata	ccc	tat	gat	cca	agc		941
Ala	Tyr	Gly	Ile	Glu	Val	Glu	Val	Glu	Ser	Ile	Pro	Tyr	Asp	Pro	Ser		
			255					260					265				
cta	atg	gtt	ttc	atg	gat	tat	aga	gac	tac	acc	aaa	cat	aaa	tct	caa		989
Leu	Met	Val	Phe	Met	Asp	Tyr	Arg	Asp	Tyr	Thr	Lys	His	Lys	Ser	Gln		
		270					275					280					
tca	cta	gaa	gca	caa	tat	cca	aca	ttt	ttg	tat	gtc	atg	cca	atg	tct		1037
Ser	Leu	Glu	Ala	Gln	Tyr	Pro	Thr	Phe	Leu	Tyr	Val	Met	Pro	Met	Ser		
		285				290					295						
cca	act	aaa	gta	ttc	ttt	gag	gaa	act	tgt	ttg	gct	tca	aaa	gag	gcc		1085
Pro	Thr	Lys	Val	Phe	Phe	Glu	Glu	Thr	Cys	Leu	Ala	Ser	Lys	Glu	Ala		
300					305				310					315			
atg	cct	ttt	gag	tta	ttg	aag	aca	aaa	ctc	atg	tca	aga	tta	aag	act		1133
Met	Pro	Phe	Glu	Leu	Leu	Lys	Thr	Lys	Leu	Met	Ser	Arg	Leu	Lys	Thr		
				320					325					330			
atg	ggg	atc	cga	ata	acc	aaa	act	tat	gaa	gag	gaa	tgg	tca	tat	att		1181
Met	Gly	Ile	Arg	Ile	Thr	Lys	Thr	Tyr	Glu	Glu	Glu	Trp	Ser	Tyr	Ile		
			335					340					345				
cca	gta	ggt	gga	tcc	tta	cca	aat	acc	gag	caa	aag	aac	ctt	gca	ttt		1229
Pro	Val	Gly	Gly	Ser	Leu	Pro	Asn	Thr	Glu	Gln	Lys	Asn	Leu	Ala	Phe		
		350					355					360					
ggt	gct	gct	gct	agc	atg	gtg	cat	cca	gcc	aca	gga	tat	tcg	gtt	gta		1277
Gly	Ala	Ala	Ala	Ser	Met	Val	His	Pro	Ala	Thr	Gly	Tyr	Ser	Val	Val		
		365				370					375						
aga	tca	ctg	tca	gaa	gct	cct	aat	tat	gca	gca	gta	att	gca	aag	att		1325
Arg	Ser	Leu	Ser	Glu	Ala	Pro	Asn	Tyr	Ala	Ala	Val	Ile	Ala	Lys	Ile		
380					385				390					395			
tta	ggg	aaa	gga	aat	tca	aaa	cag	atg	ctt	gat	cat	gga	aga	tac	aca		1373
Leu	Gly	Lys	Gly	Asn	Ser	Lys	Gln	Met	Leu	Asp	His	Gly	Arg	Tyr	Thr		
				400					405					410			
acc	aac	atc	tca	aag	caa	gct	tgg	gaa	aca	ctt	tgg	ccc	ctt	gaa	agg		1421
Thr	Asn	Ile	Ser	Lys	Gln	Ala	Trp	Glu	Thr	Leu	Trp	Pro	Leu	Glu	Arg		
			415					420				425					
aaa	aga	cag	aga	gca	ttc	ttt	ctc	ttt	gga	tta	gca	ctg	att	gtc	cag		1469
Lys	Arg	Gln	Arg	Ala	Phe	Phe	Leu	Phe	Gly	Leu	Ala	Leu	Ile	Val	Gln		
		430					435					440					
atg	gat	att	gag	ggg	acc	cgc	aca	ttc	ttc	cgg	act	ttc	ttc	cgc	ttg		1517
Met	Asp	Ile	Glu	Gly	Thr	Arg	Thr	Phe	Phe	Arg	Thr	Phe	Phe	Arg	Leu		
		445				450					455						
ccc	aca	tgg	atg	tgg	tgg	ggg	ttt	ctt	gga	tct	tcg	tta	tca	tca	act		1565
Pro	Thr	Trp	Met	Trp	Trp	Gly	Phe	Leu	Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr		

460	465	470	475	
gac ttg ata ata ttt gcg ttt tac atg ttt atc ata gca ccg cat agc				1613
Asp Leu Ile Ile Phe Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser				
	480	485	490	
ctg aga atg ggt ctg gtt aga cat ttg ctt tct gac ccg aca gga gga				1661
Leu Arg Met Gly Leu Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly				
	495	500	505	
aca atg tta aaa gcg tat ctc acg ata taa ataactctag tcgcgatcag				1711
Thr Met Leu Lys Ala Tyr Leu Thr Ile				
	510	515		
tttagattat aggcacatct tgcatatata tatgtataaa ccttatgtgt gctgtatcct				1771
tacatcaaca cagtcattaa ttgtattttct tggggtaatg ctgatgaagt attttctgg				1830
<210> 5				
<211> 516				
<212> PRT				
<213> Tagetes erecta				
<400> 5				
Met Ser Met Arg Ala Gly His Met Thr Ala Thr Met Ala Ala Phe Thr				
1	5	10	15	
Cys Pro Arg Phe Met Thr Ser Ile Arg Tyr Thr Lys Gln Ile Lys Cys				
	20	25	30	
Asn Ala Ala Lys Ser Gln Leu Val Val Lys Gln Glu Ile Glu Glu Glu				
	35	40	45	
Glu Asp Tyr Val Lys Ala Gly Gly Ser Glu Leu Leu Phe Val Gln Met				
	50	55	60	
Gln Gln Asn Lys Ser Met Asp Ala Gln Ser Ser Leu Ser Gln Lys Leu				
	65	70	75	80
Pro Arg Val Pro Ile Gly Gly Gly Gly Asp Ser Asn Cys Ile Leu Asp				
	85	90	95	
Leu Val Val Ile Gly Cys Gly Pro Ala Gly Leu Ala Leu Ala Gly Glu				
	100	105	110	
Ser Ala Lys Leu Gly Leu Asn Val Ala Leu Ile Gly Pro Asp Leu Pro				
	115	120	125	

Phe Thr Asn Asn Tyr Gly Val Trp Glu Asp Glu Phe Ile Gly Leu Gly  
130 135 140

Leu Glu Gly Cys Ile Glu His Val Trp Arg Asp Thr Val Val Tyr Leu  
145 150 155 160

Asp Asp Asn Asp Pro Ile Leu Ile Gly Arg Ala Tyr Gly Arg Val Ser  
165 170 175

Arg Asp Leu Leu His Glu Glu Leu Leu Thr Arg Cys Met Glu Ser Gly  
180 185 190

Val Ser Tyr Leu Ser Ser Lys Val Glu Arg Ile Thr Glu Ala Pro Asn  
195 200 205

Gly Leu Ser Leu Ile Glu Cys Glu Gly Asn Ile Thr Ile Pro Cys Arg  
210 215 220

Leu Ala Thr Val Ala Ser Gly Ala Ala Ser Gly Lys Leu Leu Gln Tyr  
225 230 235 240

Glu Leu Gly Gly Pro Arg Val Cys Val Gln Thr Ala Tyr Gly Ile Glu  
245 250 255

Val Glu Val Glu Ser Ile Pro Tyr Asp Pro Ser Leu Met Val Phe Met  
260 265 270

Asp Tyr Arg Asp Tyr Thr Lys His Lys Ser Gln Ser Leu Glu Ala Gln  
275 280 285

Tyr Pro Thr Phe Leu Tyr Val Met Pro Met Ser Pro Thr Lys Val Phe  
290 295 300

Phe Glu Glu Thr Cys Leu Ala Ser Lys Glu Ala Met Pro Phe Glu Leu  
305 310 315 320

Leu Lys Thr Lys Leu Met Ser Arg Leu Lys Thr Met Gly Ile Arg Ile  
325 330 335

Thr Lys Thr Tyr Glu Glu Glu Trp Ser Tyr Ile Pro Val Gly Gly Ser  
340 345 350

Leu Pro Asn Thr Glu Gln Lys Asn Leu Ala Phe Gly Ala Ala Ala Ser  
 355 360 365

Met Val His Pro Ala Thr Gly Tyr Ser Val Val Arg Ser Leu Ser Glu  
 370 375 380

Ala Pro Asn Tyr Ala Ala Val Ile Ala Lys Ile Leu Gly Lys Gly Asn  
 385 390 395 400

Ser Lys Gln Met Leu Asp His Gly Arg Tyr Thr Thr Asn Ile Ser Lys  
 405 410 415

Gln Ala Trp Glu Thr Leu Trp Pro Leu Glu Arg Lys Arg Gln Arg Ala  
 420 425 430

Phe Phe Leu Phe Gly Leu Ala Leu Ile Val Gln Met Asp Ile Glu Gly  
 435 440 445

Thr Arg Thr Phe Phe Arg Thr Phe Phe Arg Leu Pro Thr Trp Met Trp  
 450 455 460

Trp Gly Phe Leu Gly Ser Ser Leu Ser Ser Thr Asp Leu Ile Ile Phe  
 465 470 475 480

Ala Phe Tyr Met Phe Ile Ile Ala Pro His Ser Leu Arg Met Gly Leu  
 485 490 495

Val Arg His Leu Leu Ser Asp Pro Thr Gly Gly Thr Met Leu Lys Ala  
 500 505 510

Tyr Leu Thr Ile  
 515

<210> 6  
 <211> 445  
 <212> DNA  
 <213> tagetes erecta

<220>  
 <221> Sense-Fragment  
 <222> (1)..(445)  
 <223>

<400> 6  
 aagcttgac gaggcaaagc aaaggttggt tgttggtgtt gttgagagac actccaatcc 60



```

aacagatac aaggcgtgac tggatatttc tctctcgttc ctaacaacag caacgaagaa 120
gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat 180
ggcggcgtttt acatgcccta ggtttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg 240
caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt 300
gaaagccggt ggatcggagc tgctttttgt tcaaattgcaa cagaataagt ccatggatgc 360
acagtctagc ctatcccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa 420
ctgtatactg gatttggttg tcgac 445

```

```

<210> 7
<211> 446
<212> DNA
<213> tagetes erecta

```

```

<220>
<221> Antisense Fragment
<222> (1)..(446)
<223>

```

```

<400> 7
gaattcgcac gaggcaaagc aaagggtggt tgttggtggt gttgagagac actccaatcc 60
aacagatac aaggcgtgac tggatatttc tctctcgttc ctaacaacag caacgaagaa 120
gaaaaagaat cattactaac aatcaatgag tatgagagct ggacacatga cggcaacaat 180
ggcggcgtttt acatgcccta ggtttatgac tagcatcaga tacacgaagc aaattaagtg 240
caacgctgct aaaagccagc tagtcgttaa acaagagatt gaggaggaag aagattatgt 300
gaaagccggt ggatcggagc tgctttttgt tcaaattgcaa cagaataagt ccatggatgc 360
acagtctagc ctatcccaaa agctcccaag ggtaccaata ggaggaggag gagacagtaa 420
ctgtatactg gatttggttg gaccc 446

```

```

<210> 8
<211> 393
<212> DNA
<213> Tagetes erecta

```

```

<220>
<221> Sense Fragment
<222> (1)..(393)
<223>

```

```

<400> 8

```

```

aagcttttga ttagcactga ttgtccagat ggatattgag gggacccgca cattcttccg      60
gactttcttc cgcttgccca catggatgtg gtggggggtt cttggatctt cgttatcatc      120
aactgacttg ataatatattg cgttttacat gtttatcata gcaccgcata gcctgagaat      180
gggtctgggt agacatttgc tttctgaccc gacaggagga acaatgttaa aagcgtatct      240
cacgatataa ataactctag tcgcgatcag tttagattat aggcacatct tgcatatata      300
tatgtataaa ccttatgtgt gctgtatcct tacatcaaca cagtcattaa ttgtatttct      360
tggggtaatg ctgatgaagt attttctgtc gac                                     393

```

```

<210> 9
<211> 397
<212> DNA
<213> Tagetes erecta

<220>
<221> AntisenseFragment
<222> (1)..(397)
<223>

```

```

<400> 9
gaattctctt tggattagca ctgattgtcc agatggatat tgaggggacc cgcacattct      60
tccggacttt cttccgcttg cccacatgga tgtggtgggg gtttcttgga tcttcgttat      120
catcaactga cttgataata tttgcgtttt acatgtttat catagcaccg catagcctga      180
gaatgggtct ggtagacat ttgctttctg acccgacagg aggaacaatg ttaaaagcgt      240
atctcacgat ataaataact ctagtcgcga tcagttttaga ttataggcac atcttgcata      300
tatatatgta taaaccttat gtgtgctgta tccttacatc aacacagtca ttaattgtat      360
ttcttggggg aatgctgatg aagtattttc tggatcc                                     397

```

```

<210> 10
<211> 1537
<212> DNA
<213> -

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(1537)
<223>

```

```

<400> 10
gagctctaca aattaggggt actttattca ttttcatcca ttctctttat tggttaaatt      60
tgtacattta ttcaataata ttatatgttt attacaaatt ctacttttct tattcatacc      120

```

tattcactca agcctttacc atcttccttt tctatttcaa tactatttct acttcatttt	180
tcacgttttt aacatctttc tttattttct gtccacttcg tttagggatg cctaagtgc	240
caaatttcat ctctcgtagt aacacaaaac caatgtaatg ctacttctct ctacattttt	300
aatacaaaata aagtgaaca aaatatctat aaataaaca atatatatat tttgttagac	360
gctgtctcaa cccatcaatt aaaaaatttt gttatatttc tactttacct actaaatttg	420
tttctcatat ttacctttta acccccacaa aaaaaaatta taaaaaagaa agaaaaaagc	480
taaaccctat ttaaatagct aactataaga tcttaaaatt atcctcatca gtgtatagtt	540
taattgggta ttaacttata acattatata tctatgacat atactctctc ctagctattt	600
ctcacatttt ttaacttaag aaaatagtca taacatagtc taaaattcaa acatccacat	660
gctctaattt gattaacaaa aagttagaaa tattttattta aataaaaaag actaataaat	720
atataaaatg aatgttcata cgcagacca tttagagatg agtatgcttt cacatgctga	780
gattattttc aaaactaagg ttgtagcaat attaaatcaa taaaattatt ataaataaca	840
aaattaacct gctcgtgttt gctgtatatg ggaggctaca aaataaatta aactaaagat	900
gattatgttt tagacatttt ttctatctgt attagtttat acatattaat tcaggagctg	960
cacaacccaa ttctattttc gttccttggt ggctgggttt ctcacaaggt tcaatagtca	1020
atattagggt ttattggact tttaatagta tcaaacaaat ctatgtgtga acttaaaaat	1080
tgtattaaat atttagggta acctgttgcc gtttttagaa taatgtttct tcttaataca	1140
cgaaagcgta ttgtgtattc attcatttg cgcctcacat gcttcggttg gctcgtttta	1200
gtctctgcct tctttgtata ttgtactccc cctcttccta tgccacgtgt tctgagctta	1260
acaagccacg ttgctgcca ttgccaaca agtcatttta acttcacaag gtccgatttg	1320
acctccaaaa caacgacaag tttccgaaca gtcgcgaaga tcaagggtat aatcgtcttt	1380
ttgaattcta tttctcttta tttaatagtc cctctcgtgt gatagttttt aaaagatttt	1440
taaaacgtag ctgctgttta agtaaatccc agtccttcag tttgtgcttt tgtgtgtttt	1500
gtttctctga tttacggaat ttggaaataa taagctt	1537

<210> 11  
 <211> 734  
 <212> DNA  
 <213> kuenstliche Sequenz

<220>  
 <221> variation

&lt;222&gt; (1)..(734)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 11

ctaacaatca atgagtagag agctggacac atgacggcaa caatggcggc ttttacatgc	60
cctaggttta tgactagcat cagatacacg aagcaaatta agtgcaacgc tgctaaaagc	120
cagctagtcg ttaaacaaga gattgaggag gaagaagatt atgtgaaagc cggtaggatcg	180
gagctgcttt ttgttcaa at gcaacagaat aagtccatgg atgcacagtc tagcctatcc	240
caaaagggtca ctccagactt aattgcttat aaataaataa atatgttttt taggaataat	300
gatattttaga tagattagct atcacctgtg ctgtgggtgtg cagctcccaa gggctcttacc	360
gatagtaaaa tcgttagtta tgattaatac ttggggaggtg ggggattata ggctttgttg	420
tgagaatggt gagaaagagg ttgacaaat cgggtgttga atgagggtta atggaggtta	480
attaaaataa agagaagaga aagattaaga ggggtgatggg gatattaaag acggscaata	540
tagtgatgcc acgtagaaaa aggtaagtga aaacatacaa cgtggcttta aaagatggct	600
tggctgctaa tcaactcaac tcaactcata tcctatccat tcaaattcaa ttcaattcta	660
ttgaatgcaa agcaaagcaa aggttgtttg ttgttggtgt tgagagacac tccaatccaa	720
acagatacaa ggcg	734

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 280

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; kuenstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; variation

&lt;222&gt; (1)..(280)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 12

gtcgagtatg gagttcaatt aaaataaaga gaagaraaag attaagaggg tgatggggat	60
attaaagacg gccaatrtag tgatgccacg taagaaaaag gtaagtgaaa acatacaacg	120
tggctttaa agatggcttg gctgctaatac aactcaactc aactcatatc ctatccattc	180
aaattcaatt caattctatt gaatgcaaag caaagcaaag caaaggttgt ttgttggtgt	240
tgttgagaga cactccaatc caaacagata caaggcgtga	280

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 358

<212> DNA  
 <213> Tagetes erecta

<220>  
 <221> (Sense) Promotor  
 <222> (1)..(358)  
 <223>

<400> 13  
 aagcttaccg atagtāaaat cgtaggttat gattaatact tgggaggtgg gggattatag 60  
 gctttgttgt gagaatgttg agaaagaggt ttgacaaatc ggtgtttgaa tgagggttaa 120  
 tggaggttaa ttaaaataaa gagaagagaa agattaagag ggtgatgggg atattaaaga 180  
 cggccaatat agtgatgcca cgtagaaaaa ggtaagtga aacatacaac gtggctttaa 240  
 aagatggcctt ggctgctaata caactcaact caactcatat cctatccatt caaattcaat 300  
 tcaattctat tgaatgcaaa gcaaagcaaa gcaaaggttg tttgttggtg ttgtcgac 358

<210> 14  
 <211> 361  
 <212> DNA  
 <213> Tagetes erecta

<220>  
 <221> (Antisense) Promotor  
 <222> (1)..(361)  
 <223>

<400> 14  
 ctcgagctta ccgatagtaa aatcggttagt tatgattaat acttgggagg tgggggatta 60  
 taggctttgt tgtgagaatg ttgagaaaga ggtttgacaa atcgggtgtt gaatgaggtt 120  
 aaatggagtt taattaaaat aaagagaaga gaaagattaa gaggggtgatg gggatattaa 180  
 agacggccaa tatagtgatg ccacgtagaa aaaggtaagt gaaaacatac aacgtggcct 240  
 taaaagatgg cttggctgct aatcaactca actcaactca taccctatcc attcaaattc 300  
 aattcaattc tattgaatgc aaagcaaagc aaagcaaagg ttgtttgttg ttgttgatc 360  
 c 361

<210> 15  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> kuenstliche Sequenz

<220>  
 <221> Primer

<222> (1)..(28)  
<223>

<400> 15  
gagctcactc actgatttcc attgcttg

28

<210> 16  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(37)  
<223>

<400> 16  
cgccgttaag tcgatgtccg ttgatttaaa cagtgtc

37

<210> 17  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(34)  
<223>

<400> 17  
atcaacggac atcgacttaa cggcgtttgt aaac

34

<210> 18  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(25)  
<223>

<400> 18  
taagcttttt gttgaagaga tttgg

25

<210> 19  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(23)  
<223>

<400> 19  
gaaaataactt catcagcatt acc

23

<210> 20  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(28)  
<223>

<400> 20  
gtcgactacg taagtttctg cttctacc

28

<210> 21  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(26)  
<223>

<400> 21  
ggatccggtg atacctgcac atcaac

26

<210> 22  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(28)  
<223>

<400> 22  
aagcttgac gaggcaaagc aaagggtg

28

<210> 23

<211> 29  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(29)  
<223>

<400> 23  
gtcgacaacc aaatccagta tacagttac

29

<210> 24  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(30)  
<223>

<400> 24  
aggatccaac caaatccagt atacagttac

30

<210> 25  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(28)  
<223>

<400> 25  
gaattcgac gaggcaaagc aaagggtg

28

<210> 26  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(25)  
<223>

<400> 26  
aagcttttga ttagcactga ttgtc

25



<210> 27  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(29)  
<223>

<400> 27  
gtcgacagaa aatacttcat cagcattac

29

<210> 28  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(29)  
<223>

<400> 28  
ggatccagaa aatacttcat cagcattac

29

<210> 29  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(27)  
<223>

<400> 29  
gaattctctt tggattagca ctgattg

27

<210> 30  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(23)  
<223>

<400> 30  
cgcccttgat ctgtttggat tgg 23

<210> 31  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(24)  
<223>

<400> 31  
ctaacaatca atgagtatga gagc 24

<210> 32  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(26)  
<223>

<400> 32  
agagcaaggc cagcaggacc acaacc 26

<210> 33  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(26)  
<223>

<400> 33  
ccttgggagc ttttgggata ggctag 26

<210> 34  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer

<222> (1)..(26)  
<223>

<400> 34  
tcacgccttg tatctgtttg gattgg

26

<210> 35  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(15)  
<223>

<400> 35  
gtcgagtatg gagtt

15

<210> 36  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(28)  
<223>

<400> 36  
aagcttaccg atagtaaaat cgttagtt

28

<210> 37  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(31)  
<223>

<400> 37  
ctcgagctta ccgatagtaa aatcgttagt t

31

<210> 38  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(28)  
<223>

<400> 38  
gtcgacaaca acaacaaaca acctttgc

28

<210> 39  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(28)  
<223>

<400> 39  
ggatccaaca acaacaaaca acctttgc

28

<210> 40  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(28)  
<223>

<400> 40  
gtcgactttt tgttgaagag atttggtg

28

<210> 41  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> kuenstliche Sequenz

<220>  
<221> Primer  
<222> (1)..(28)  
<223>

<400> 41  
ctcgagactc actgatttcc attgcttg

28

<210> 42

<211> 22  
 <212> DNA  
 <213> kuenstliche Sequenz

<220>  
 <221> Primer  
 <222> (1)..(22)  
 <223>

<400> 42  
 gagctctaca aattagggtt ac

22

<210> 43  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> kuenstliche Sequenz

<220>  
 <221> Primer  
 <222> (1)..(23)  
 <223>

<400> 43  
 aagcttatta tttccaaatt ccg

23

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukten durch Kultivierung von genetisch veränderten Pflanzen die im Vergleich zum Wildtyp eine, durch doppelsträngige  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenzen verursachte, reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man in die Pflanze eine RNA einbringt, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Bereich mit Doppel-Strang-Struktur eine Nukleinsäuresequenz enthält, die mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und das 5'-Ende oder das 3'-Ende der Pflanze eigenen Nukleinsäure, kodierend eine  $\epsilon$ -Cyclase enthält.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass der Bereich mit Doppel-Strang-Struktur jeweils einen "sense"-RNA-Strang enthält, umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA- $\epsilon$ -Cyclase Transkriptes, und einen "antisense"-RNA-Strang enthält, der zu dem „sense“-RNA-Strang im wesentlichen komplementär ist.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch veränderte Pflanzen verwendet, die in Blüten die geringste Expressionsrate einer  $\epsilon$ -Cyclase aufweisen.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Transkription der doppelsträngigen  $\epsilon$ -Cyclase Ribonukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines blütenspezifischen Promotors erfolgt.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae,

Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae verwendet.

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcubita, Cytisus, Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotheca, Doronicum, Eschscholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevilla, Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hibiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leontodon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia verwendet.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass man als Pflanze eine Pflanze, ausgewählt aus den Pflanzenarten Marigold, Tagetes erecta oder Tagetes patula verwendet.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass man nach dem Kultivieren die genetisch veränderten Pflanzen erntet und anschließend Zeaxanthin und/oder dessen biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukte aus den Pflanzen isoliert.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die biosynthetischen Zwischen- und/oder Folgeprodukte ausgewählt sind aus der Gruppe Lycopin,  $\beta$ -Carotin, Astaxanthin, Canthaxanthin, Echinenon, 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon, Adonirubin Adonixanthin, Antheraxanthin, Violaxanthin, Neoxanthin, Capsorubin, und Capsanthin.

12. Ribonukleinsäurekonstrukt, enthaltend RNA, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

13. Nukleinsäurekonstrukt, transkribierbar in

- a) einen "sense"-RNA-Strang umfassend mindestens eine Ribonukleotidsequenz, die im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des "sense"-RNA- $\epsilon$ -Cyclase Transkriptes, und
- b) einen "antisense"-RNA-Strang, der zu dem RNA-sense-Strang unter a) im wesentlichen – bevorzugt vollständig – komplementär ist.

14. Nukleinsäurekonstrukt, umfassend

- a) einen "sense"-DNA-Strang der im wesentlichen identisch ist zu mindestens einem Teil des Promotorbereichs eines  $\epsilon$ -Cyclase-Gens, und
- b) einen "antisense"-DNA-Strang, der zu dem DNA-"sense"-Strang unter a) im wesentlichen – bevorzugt vollständig – komplementär ist.

15. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 13, wobei die aus dem  $\epsilon$ -Cyclase-Trankript ableitbare cDNA-Sequenz durch SEQ. ID. NO. 4 beschrieben ist.

16. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 14, wobei die Nukleinsäuresequenz des Promotorbereichs des  $\epsilon$ -Cyclase-Gens durch SEQ. ID. NO. 13 beschrieben ist.

17. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 12 bis 16, wobei "sense"-RNA-Strang und "antisense"-RNA-Strang kovalent in Form eines invertierten Repeats miteinander verbunden sind.

18. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 12 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäurekonstrukt zusätzlich funktionell verknüpft einen Promotor enthält.

19. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass man einen blütenspezifischen Promotor verwendet.

20. Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass man Expressionskassetten, enthaltend ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß einem der Ansprüche 12 bis 19, in eine Ausgangspflanze einführt.

21. Genetisch veränderte Pflanze, die im Vergleich zum Wildtyp eine, durch doppelsträngige  $\epsilon$ -Cyclase-Ribonukleinsäuresequenzen verursachte, reduzierte  $\epsilon$ -Cyclase-Aktivität aufweisen.

22. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderte Pflanze eine RNA enthält, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz enthält, die

- a) mit mindestens einem Teil des Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Transkripts identisch ist und/oder
- b) mit mindestens einem Teil der Pflanze eigenen  $\epsilon$ -Cyclase-Promotor-Sequenz identisch ist.

23. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanze ausgewählt ist aus den Familien Ranunculaceae, Berberidaceae, Papaveraceae, Cannabaceae, Rosaceae, Fabaceae, Linaceae, Vitaceae, Brassicaceae, Cucurbitaceae, Primulaceae, Caryophyllaceae, Amaranthaceae, Gentianaceae, Geraniaceae, Caprifoliaceae, Oleaceae, Tropaeolaceae, Solanaceae, Scrophulariaceae, Asteraceae, Liliaceae, Amaryllidaceae, Poaceae, Orchidaceae, Malvaceae, Illiaceae oder Lamiaceae.

24. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanze ausgewählt ist aus den Pflanzengattungen Marigold, Tagetes, Acacia, Aconitum, Adonis, Arnica, Aquilegia, Aster, Astragalus, Bignonia, Calendula, Caltha, Campanula, Canna, Centaurea, Cheiranthus, Chrysanthemum, Citrus, Crepis, Crocus, Curcubita, Cytisus, Delonia, Delphinium, Dianthus, Dimorphotoca, Doronicum, Escholtzia, Forsythia, Fremontia, Gazania, Gelsemium, Genista, Gentiana, Geranium, Gerbera, Geum, Grevilla, Helenium, Helianthus, Hepatica, Heracleum, Hibiscus, Heliopsis, Hypericum, Hypochoeris, Impatiens, Iris, Jacaranda, Kerria, Laburnum, Lathyrus, Leontodon, Lilium, Linum, Lotus, Lycopersicon, Lysimachia, Maratia, Medicago, Mimulus, Narcissus, Oenothera, Osmanthus, Petunia, Photinia, Physalis, Phyteuma, Potentilla, Pyracantha, Ranunculus, Rhododendron, Rosa, Rudbeckia, Senecio, Silene, Silphium, Sinapsis, Sorbus, Spartium, Tecoma, Torenia, Tragopogon, Trollius, Tropaeolum, Tulipa, Tussilago, Ulex, Viola oder Zinnia.

25. Genetisch veränderte Pflanze nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Pflanze ausgewählt ist aus den Pflanzenarten Marigold, Tagetes erecta oder Tagetes patula.

26. Verwendung der genetisch veränderten Pflanzen nach einem der Ansprüche 21 bis 25 als Zierpflanzen oder als Futter- und Nahrungsmittel.

27. Verwendung der genetisch veränderten Pflanzen nach einem der Ansprüche 21 bis 25 zur Herstellung von carotinoidhaltigen Extrakten oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmittel.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Abbildung 1: Schema der Carotinoidbiosynthese in *Tagetes erecta* Blüten

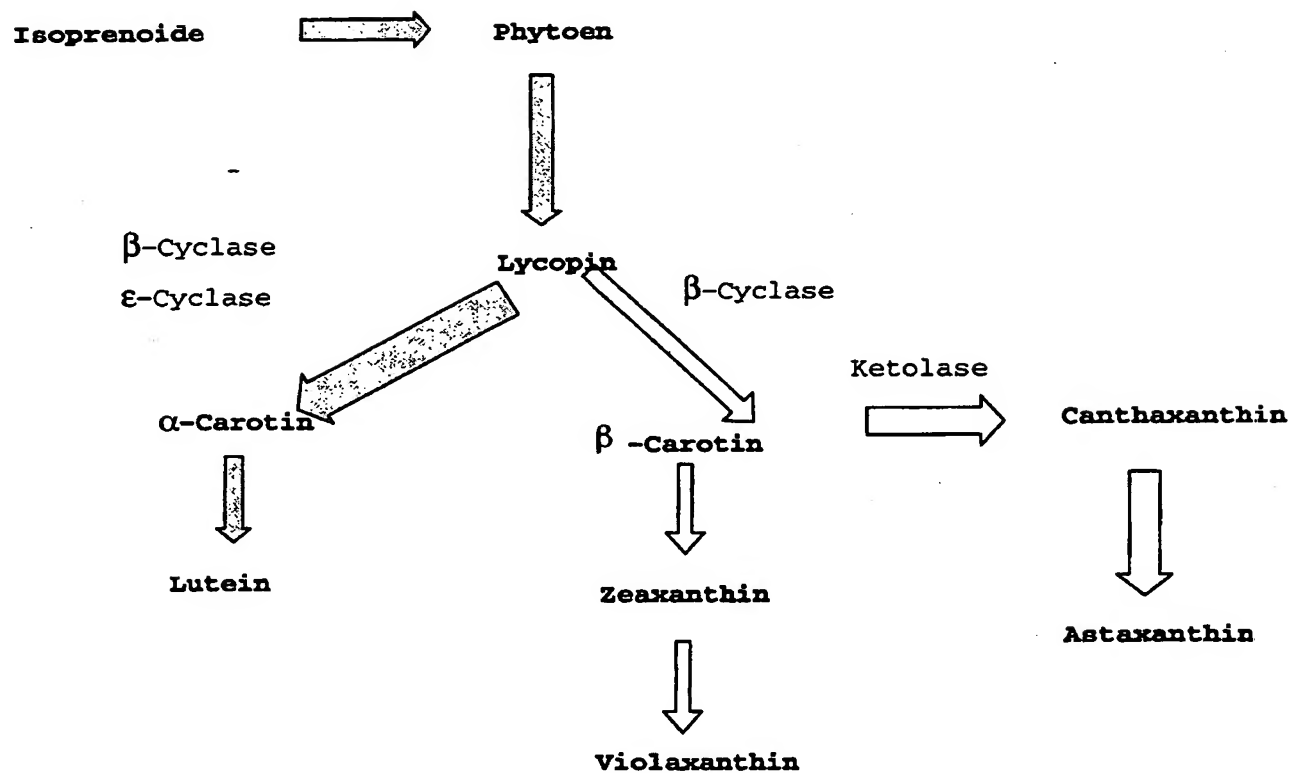




Abbildung 2: Klonierungskassette zur Herstellung von Inverted-Repeat-Expressionskassetten für die blütenspezifische Expression von Epsilon-Cyclase dsRNAs in *Tagetes erecta*

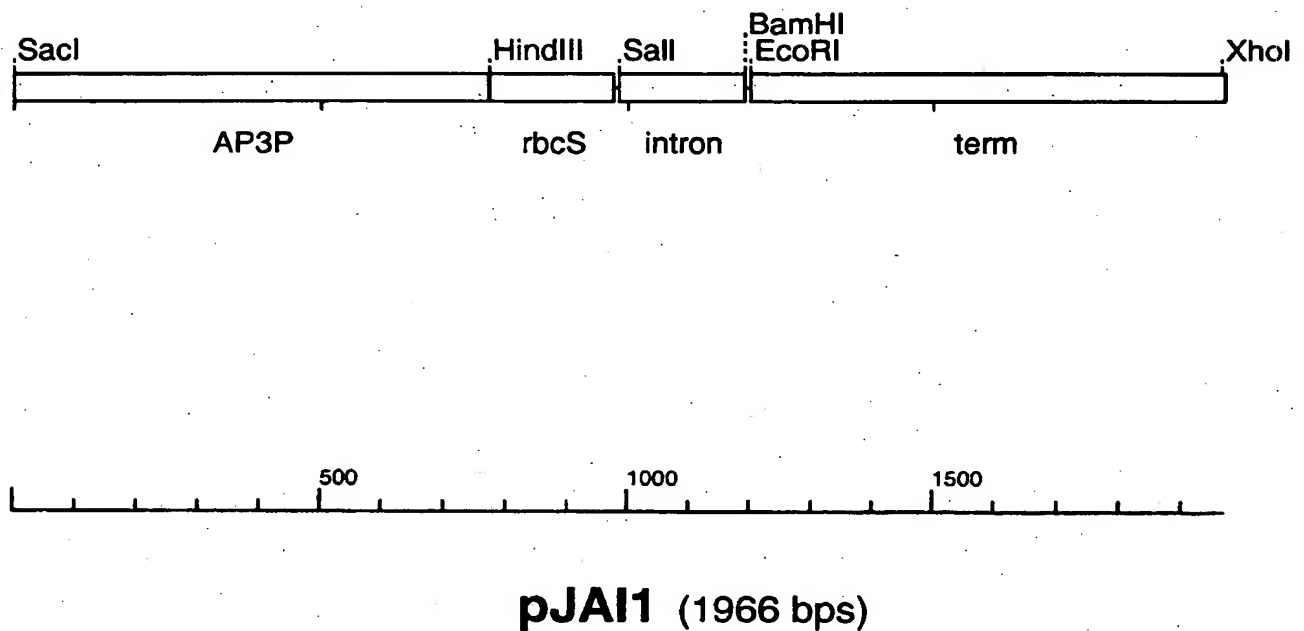


Abbildung 3: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

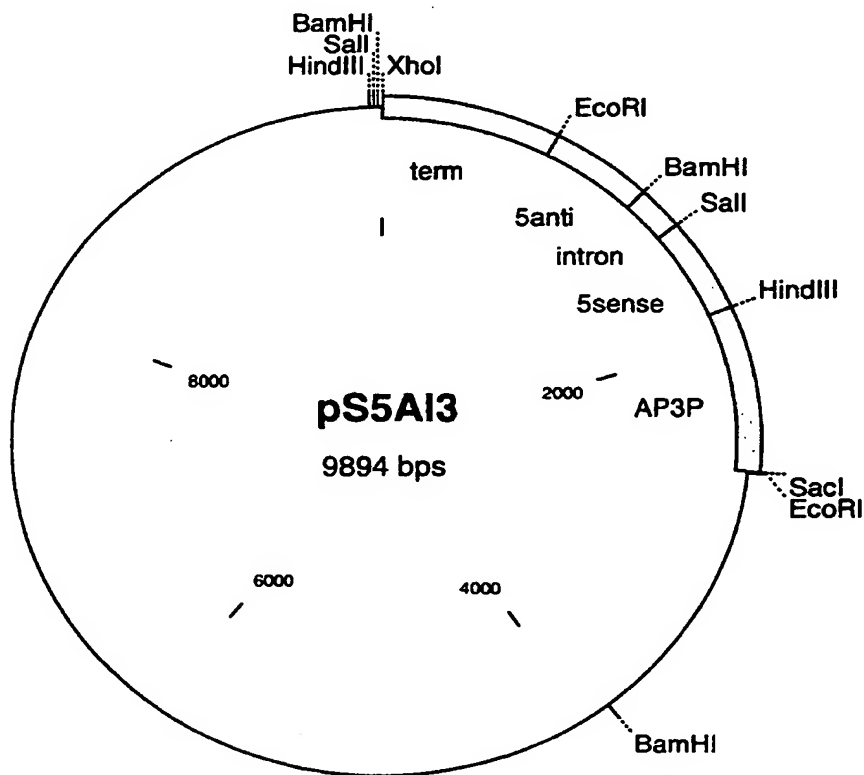


Abbildung 4: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 5'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des CHRC-Promoters

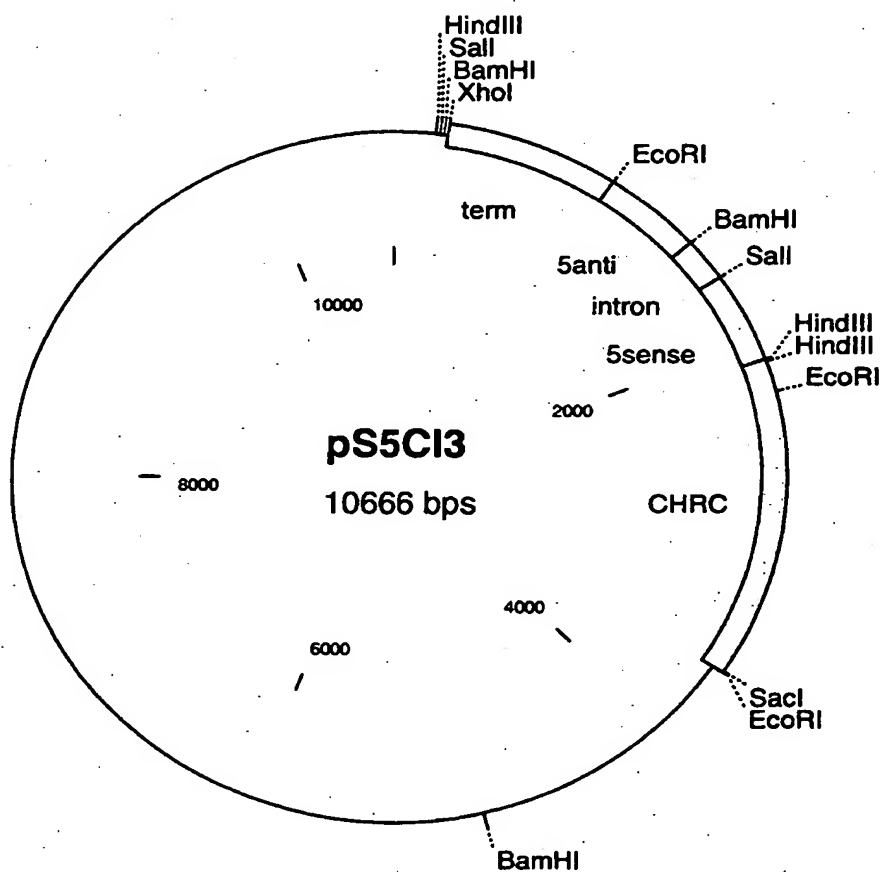


Abbildung 5: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend 3'terminale Fragmente der Epsilon-Cyclase cDNA (AF251016) unter Kontrolle des AP3P-Promoters

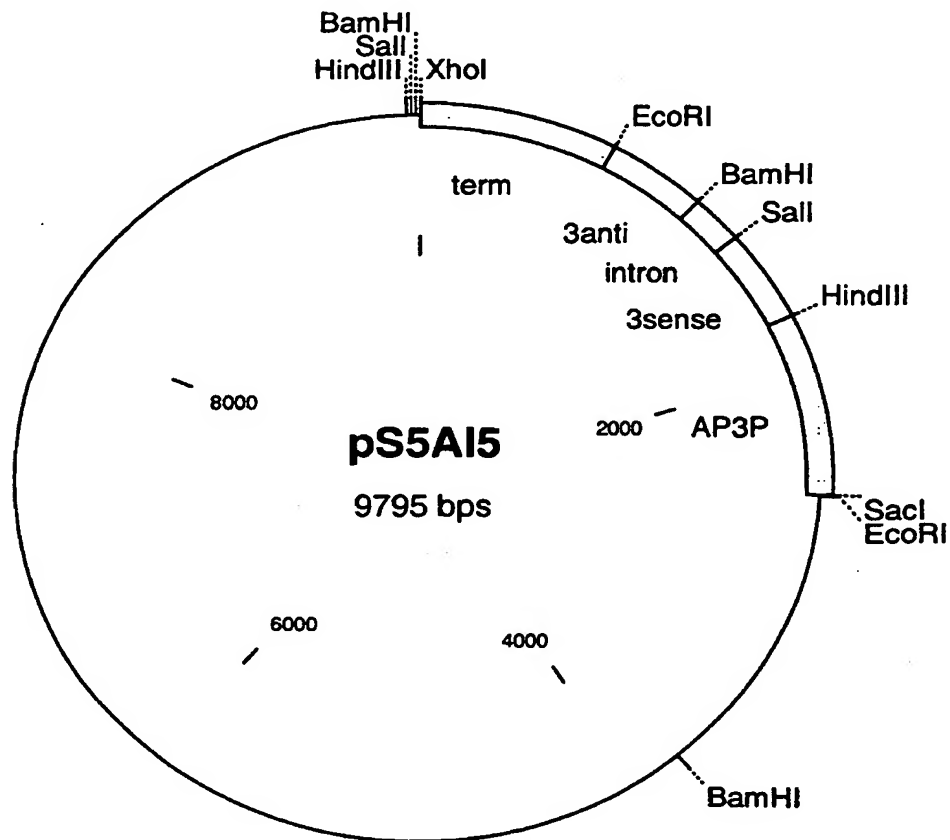


Abbildung 6: Inverse PCR-Amplifikat, das das 312 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters enthält

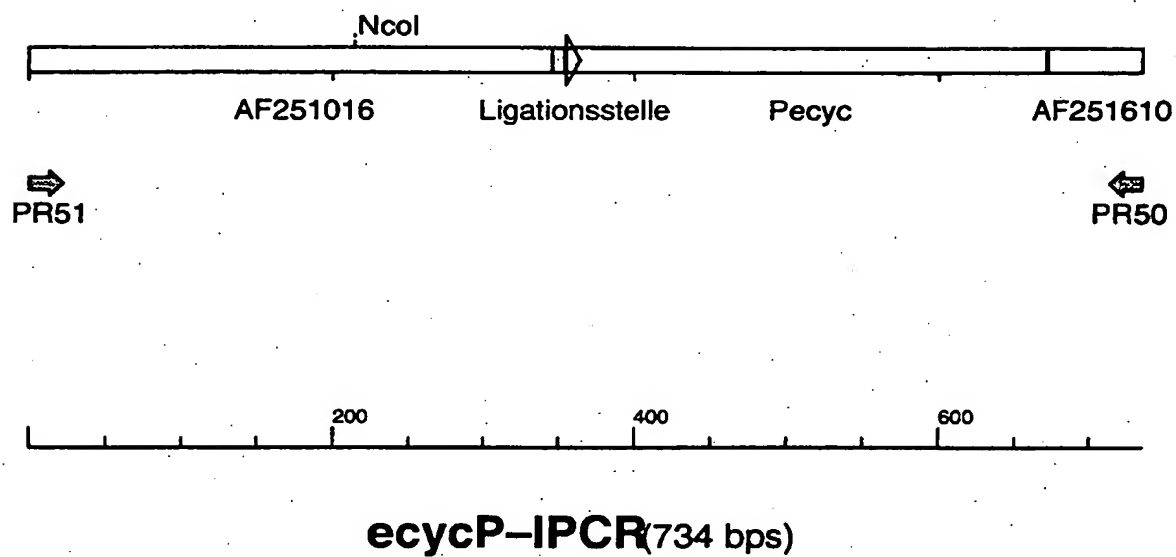
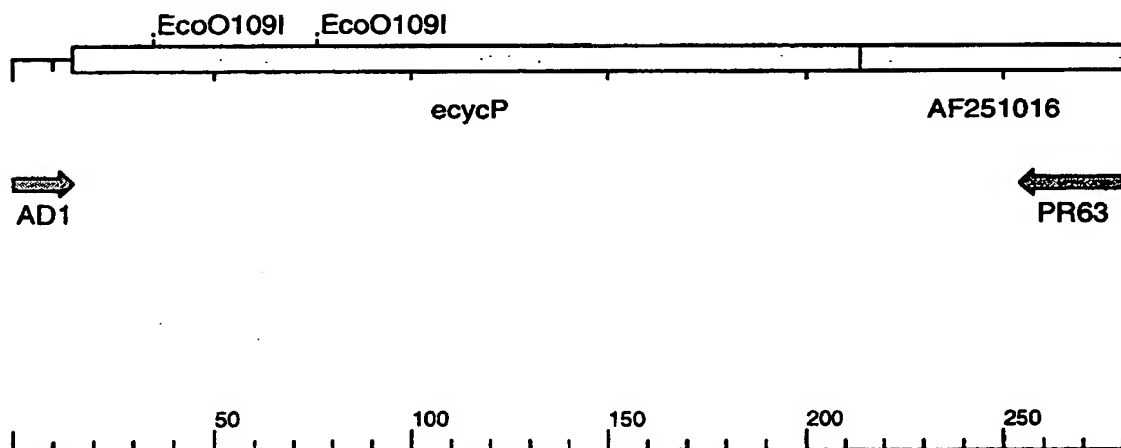


Abbildung 7: TAIL PCR-Amplifikat, das das 199 bp Fragment des Epsilon-Cyclase Promoters enthält



**ecycP-TAIL**(280 bps)

Abbildung 8: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp5 Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des AP3P-Promoters

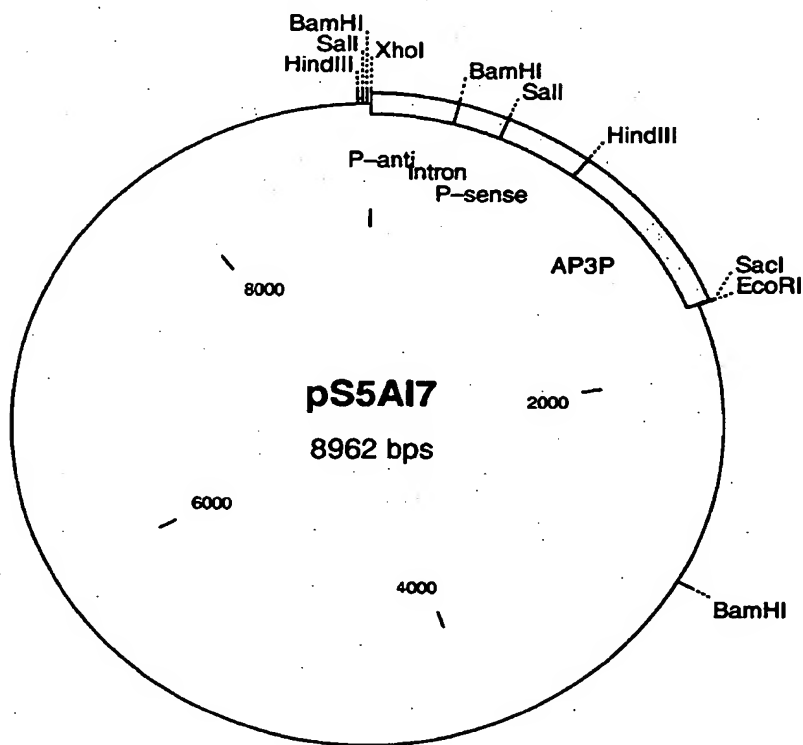


Abbildung 9: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle des CHRC-Promoters

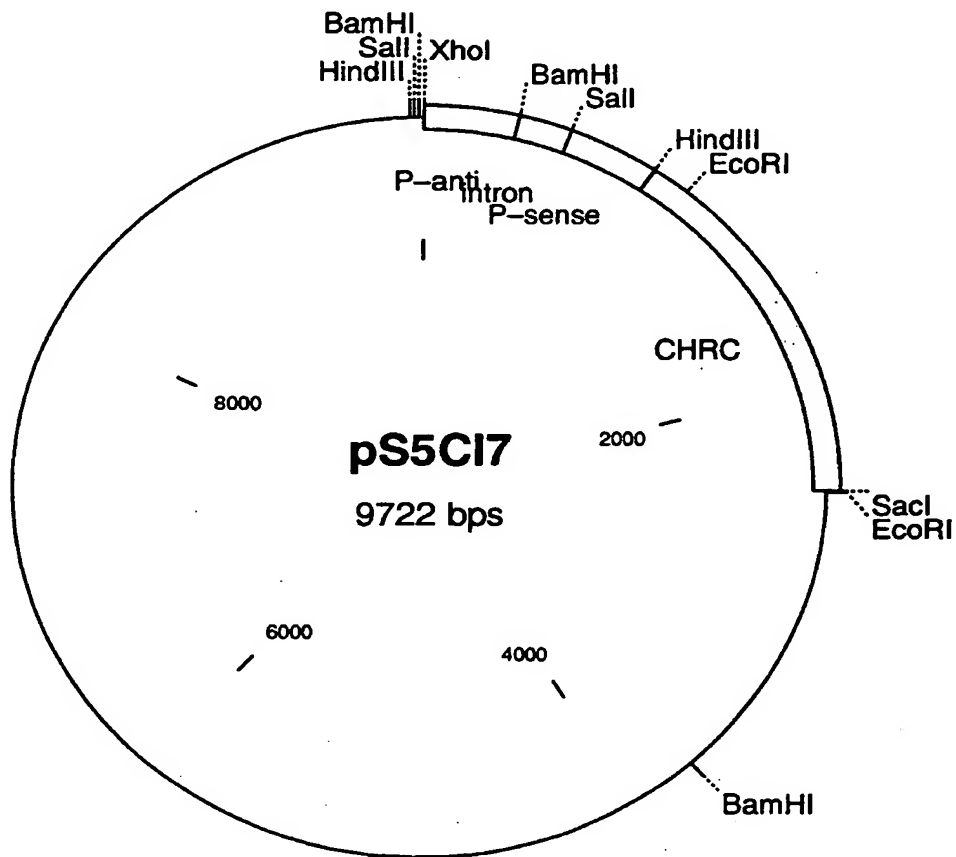
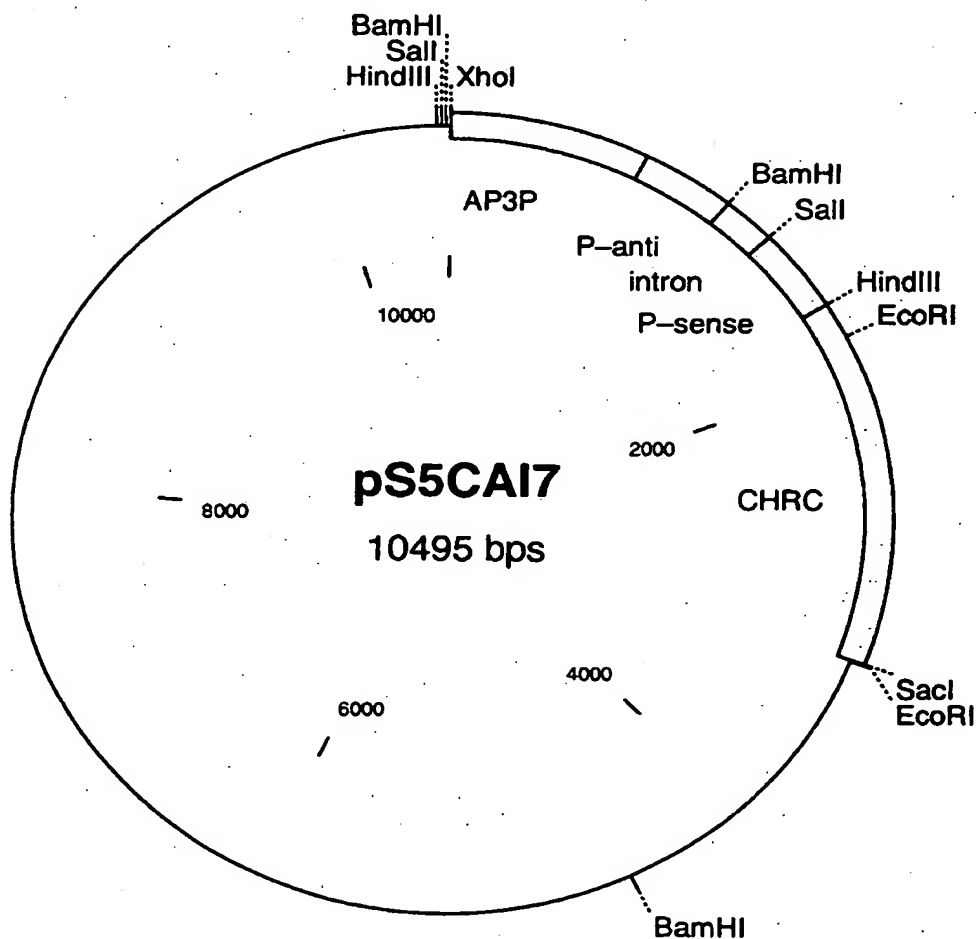




Abbildung 10: Expressionsvektor zur blütenspezifischen Produktion von dsRNA-Transkripten enthaltend das 312 bp5 Promoterfragment der Epsilon-Cyclase unter Kontrolle sowohl des AP3P-Promoters als auch des CHRC-Promoters



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**